

Aus dem Institut für Humangenetik
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Spezifische Seroreaktivitätsmuster
zur minimal-invasiven Detektion
humaner Hirntumoren

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät*

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2009

vorgelegt von Nicole Ludwig
geb. am 08.03.1981 in Püttlingen

Zusammenfassung

Mithilfe eines serologischen Spotassays bestehend aus über 60 bereits identifizierten Meningeom- bzw. Gliom-assoziierten Antigenen wurden Seroreaktivitätsmuster von über 400 Patienten aufgenommen und mit statistischen Methoden differenziert. Das Expressionsprofil von 24 Meningeomen wurde mithilfe von cDNA-Microarrays ermittelt, welche mit ca. 50.000 Transkripten den Großteil des bekannten menschlichen Transkriptoms repräsentieren. Es wurden über 1800 weitere Tumor-assoziierte Antigene identifiziert und zu einem Proteinmakroarray zusammengeführt. Basierend auf dieser Plattform wurden 110 Patientenseren und 60 Kontrollen auf Autoantikörper hin getestet.

- Es wurden komplexe Seroreaktivitätsmuster für Meningeom- und Gliompatienten etabliert.
- Unter Verwendung von statistischen Lernverfahren war eine Unterscheidung der Meningeom- bzw. Gliompatienten von Gesunden anhand ihres Seroreaktivitätsmusters in Bezug auf über 60 Hirntumor-assoziierte Antigene mit einer Klassifikationsgenauigkeit von über 90 % möglich.
- Auch mit dem vergrößerten Set von über 1800 Tumor-assoziierten Antigenen war eine Klassifizierung von Meningeom- bzw. Gliompatienten und Gesunden mit vergleichbarer Genauigkeit anhand der spezifischen Seroreaktivitätsmuster möglich.
- Sogar die serologische Unterscheidung der Meningeompatienten von Gliompatienten sowie der Gliompatienten von Patienten mit anderen intrakraniellen Neoplasien war mit einer Klassifikationsgenauigkeit von fast 90 % möglich.
- Die Meningeom- und Gliom-assoziierten Antigene wurden nach ihrem Beitrag zu den oben angeführten Klassifikationen gewichtet.
- Mehr als fünf dieser für die Klassifikationen wichtigen Antigene wurden mit pathologischen Prozessen in Meningeomen oder Gliomen in Verbindung gebracht.
- Die Seroreaktivität gegen Meningeom-assoziierte Antigene in *common type* Meningeomen wurde mit der Überexpression dieser Antigene in den autologen Tumoren statistisch signifikant korreliert.
- Die mithilfe der Microarrays erstellten Expressionsprofile von Meningeomen weisen auf eine Beteiligung von spezifischen Signalwegen, darunter auch Signalwege des Immunsystems wie z. B. die Komplement-Kaskade oder die durch

natürliche Killerzellen vermittelte Zytotoxizität, in der Pathogenese von Meningeomen hin.

Die vorliegende Arbeit leistet einen Beitrag zum weiteren Verständnis der Autoimmunantwort gegen benigne und maligne Hirntumoren, sowie deren Verwendung als minimal-invasiven Marker zur Erkennung dieser Tumore.

Specific seroreactivity patterns for minimal invasive detection of human brain tumors

Summary

Using a serological spotassay with over 60 known meningioma- and glioma-associated antigens, seroreactivity patterns of over 400 patients were established and differentiated with statistical methods. The expression profiles of 24 meningiomas were established using cDNA microarrays with about 50,000 transcripts representing most of the known human transcriptome. Over 1800 additional tumor-associated antigens have been identified and assembled into a protein macroarray. Based on this platform, 110 sera of patients and 60 sera of controls were tested for autoantibodies.

- Complex seroreactivity patterns have been established for meningioma and glioma patients.
- Differentiation of meningioma and glioma patients from healthy controls achieved a classification accuracy of over 90 % using over 60 brain-tumor-associated antigens.
- The specific seroreactivity patterns obtained with the enlarged set of over 1800 tumor-associated antigens allowed for separation of meningioma and glioma patients from healthy individuals with comparably good accuracy.
- Serological classification of meningioma patients versus glioma patients and glioma patients versus patients with other intracranial neoplasia reached a classification accuracy of nearly 90 %.
- The meningioma- and glioma-associated antigens were ranked according to their diagnostic information content for the above-mentioned classifications.
- More than five of the antigens relevant for those classifications were associated with pathological processes in meningioma and glioma.
- Seroreactivity against meningioma-associated antigens in *common type* meningioma patients has been significantly correlated to overexpression of those antigens in the autologous tumor.
- The expression profiles obtained by the microarray analysis of meningioma point toward an association of specific signaling pathways in the pathogenesis of meningiomas, among them pathways of the immune system as for example the complement cascade or the natural-killer cell mediated cytotoxicity.

This work contributes to the further understanding of autoimmune reactivity in benign and malignant brain tumors and their use as minimal invasive marker for detection of those tumors.

	Seite
ZUSAMMENFASSUNG	i
SUMMARY	iii
INHALTSVERZEICHNIS.....	iv
TABELLENVERZEICHNIS	vii
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	ix
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	x
1 EINLEITUNG	1
1.1 GLIOME	2
1.2 MENINGEOME.....	6
1.3 TUMOR-ASSOZIIERTE ANTIGENE.....	8
1.4 ZIELSETZUNG	14
2 MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 TUMORMATERIAL UND SEREN.....	18
2.2 SEROREAKTIVITÄT MITTELS SEROLOGISCHEM SPOTASSAY	18
2.2.1 <i>Serumpräabsorption</i>	20
2.2.2 <i>Serologischer Spotassay</i>	22
2.3 GENEXPRESSION IN MENINGEOMEN MITTELS MICROARRAY	24
2.3.1 <i>RNA-Isolierung und Qualitätskontrolle</i>	24
2.3.2 <i>Microarray-Analyse</i>	26
2.3.2.1 Erststrangsynthese	26
2.3.2.2 Zweitstrangsynthese und Aufreinigung der cDNA	27
2.3.2.3 In-Vitro-Transkription.....	28
2.3.2.4 Fragmentierung der cRNA und Hybridisierung.....	29
2.3.2.5 Detektion der Signale	29
2.4 SEROREAKTIVITÄT MITTELS PROTEINMAKROARRAY-SCREENING..	30
2.5 STATISTISCHE AUSWERTUNG	33
2.5.1 <i>Statistische Grundbegriffe</i>	33
2.5.1.1 Parameter einer Klassifikation	33
2.5.1.2 Mutual Information	34
2.5.2 <i>Auswertung der serologischen Spotassays von Meningeomen und Gliomen durch den Naïve Bayes Ansatz</i>	34

2.5.3	<i>Auswertung der Microarrays von Meningeomen</i>	36
2.5.4	<i>Untersuchung zur Überexpression Meningeom-assoziiierter Antigene</i>	38
2.5.4.1	Überexpression von Meningeom-assoziierten Antigenen.....	38
2.5.4.2	Veränderung der Gesamtexpression in Meningeomen in Abhängigkeit von der Seroreaktivität	39
2.5.5	<i>Auswertung des Proteinmakroarrays in Meningeomen und Gliomen</i>	40
3	ERGEBNISSE	42
3.1	MENINGEOME.....	43
3.1.1	<i>Seroreaktivität in Meningeomen mittels serologischem Spotassay</i>	43
3.1.1.1	Seroreaktivität und <i>Mutual Information</i>	44
3.1.1.2	Klassifikation von Meningeomseren.....	47
3.1.2	<i>Genexpression in Meningeomen mittels Microarray</i>	52
3.1.2.1	Differenzielle Genexpression in Meningeomen.....	53
3.1.2.2	Differenzielle Genexpression in Meningeomen in Abhängigkeit des WHO-Grades.....	56
3.1.2.3	Differenzielle Genexpression in Meningeomen in Abhängigkeit der Morphologie	58
3.1.3	<i>Zusammenhang zwischen Immunogenität und Expression von Meningeom-assoziierten Antigenen</i>	61
3.1.3.1	Expression Meningeom-assoziiierter Antigene.....	61
3.1.3.2	Veränderung der Gesamtexpression in Meningeomen in Abhängigkeit von der Seroreaktivität	64
3.1.4	<i>Seroreaktivität in Meningeomen mittels Proteinmakroarray-Screening</i>	67
3.1.4.1	Klassifikation von Meningeomseren.....	70
3.1.4.2	Frequenz der Seroreaktivität in Meningeom- und Normalseren gegenüber den Antigenen	72
3.1.4.3	Klassifikations-relevante Antigene in Meningeomen	74
3.2	GLIOME	79
3.2.1	<i>Seroreaktivität in Gliomen mittels serologischem Spotassay</i>	79
3.2.1.1	Frequenz der Seroreaktivität	80
3.2.1.2	Klassifikation von Gliomseren.....	82
3.2.1.3.	Informationsgehalt Tumor-assoziiierter Antigene für die Klassifikation von Gliomen.....	84

3.2.2	<i>Seroreaktivität in Gliomen mittels Proteinmakroarray-Screening</i>	87
3.2.2.1	Klassifikation von Gliomseren.....	87
3.2.2.2	Frequenz der Seroreaktivität gegenüber den Antigenen in Gliom- und Normalseren	89
3.2.2.3	Klassifikations-relevante Antigene in Gliomen	90
4	DISKUSSION	93
4.1	MENINGEOME.....	94
4.1.1	<i>Klassifikation von Meningeomen anhand von Seroreaktivitätsmustern mittels serologischem Spotassay</i>	94
4.1.2	<i>Klassifikation von Meningeomen anhand von Seroreaktivitätsmustern mittels Proteinmakroarray</i>	96
4.1.3	<i>Veränderungen der Genexpression in Meningeomen</i>	98
4.1.4	<i>Zusammenhang zwischen Immunogenität und Überexpression am Beispiel Meningeom-assoziiierter Antigene</i>	101
4.2	GLIOME	103
4.2.1	<i>Klassifikation von Gliomen anhand von Seroreaktivitätsmustern mittels serologischem Spotassay.....</i>	103
4.2.2	<i>Klassifikation von Gliomen anhand von Seroreaktivitätsmustern mittels Proteinmakroarray</i>	105
4.3	VERGLEICHENDE ANALYSE KLASSIFIKATIONS-RELEVANTER ANTIGENE IN MENINGEOMEN UND GLIOMEN UND MÖGLICHE BEZÜGE ZUR PATHOLOGIE VON HIRNTUMOREN.....	107
4.4	SEROREAKTIVITÄTSMUSTER ALS DIAGNOSTISCHES MITTEL ZUR ERKENNUNG VON KREBSERKRANKUNGEN	110
5	LITERATURVERZEICHNIS.....	113
6	PUBLIKATIONSLISTE	127
7	DANKSAGUNG.....	128
8	LEBENS LAUF	129

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Übersicht über die im serologischen Spotassay verwendeten Seren zur Differenzierung von Meningeomen	19
Tab. 2	Übersicht über die im serologischen Spotassay verwendeten Seren zur Differenzierung von Gliomen	19
Tab. 3	Übersicht über die verwendeten Seren zur Differenzierung von Meningeomen und Gliomen mithilfe des Proteinmakroarrays	31
Tab. 4	Seroreaktivität von Meningeompatienten und Gesunden gegenüber Meningeom-assoziierten Antigenen	46
Tab. 5	Klassifikation von Meningeomen mittels serologischem Spotassay I	48
Tab. 6	Klassifikation von Meningeomen mittels serologischem Spotassay II	50
Tab. 7	Differenziell exprimierte Gene in Meningeomen im Vergleich zu Dura-Kontrollen	53
Tab. 8	Signifikant deregulierte Kategorien in Meningeomen im Vergleich zu Dura	55
Tab. 9	Differenziell exprimierte Gene in WHO II / III Meningeomen im Vergleich zu WHO I Meningeomen	57
Tab. 10	Signifikant deregulierte Kategorien in WHO II / III Meningeomen gegenüber WHO I Meningeomen	58
Tab. 11	Differenziell exprimierte Gene in fibroblastischen Meningeomen im Vergleich zu meningoethelialen und syncytialen Meningeomen	59
Tab. 12	Signifikant deregulierte Kategorien in fibroblastischen Meningeomen gegenüber meningoethelialen und syncytialen Meningeomen	60
Tab. 13	Mittlere Expression der Antigene in Meningeomen	62
Tab. 14	Klassifikation von Meningeomen mittels Proteinmakroarray	71
Tab. 15	Häufigkeit von Autoantikörperreaktionen in Meningeompatienten im Proteinmakroarray	73
Tab. 16	Frequenz häufig detektierter Autoantikörper in Meningeomen	74
Tab. 17	Überblick über die Verteilung der AUC Werte für die Klassifikation von Meningeomen	75
Tab. 18	Klassifikations-relevante Antigene in Meningeomen	76
Tab. 19	Mittlere Seroreaktivität der im serologischen Spotassay untersuchten Patientengruppen	81
Tab. 20	Seroreaktivität von Gliompatienten und Kontrollen gegenüber Gliom-assoziierten Antigenen	82
Tab. 21	Klassifikation von Gliomen mittels serologischem Spotassay	83

Tab. 22	Klassifikation von Gliomen mittels Proteinmakroarray.....	88
Tab. 23	Häufigkeit von Autoantikörperreaktionen in Gliompatienten im Proteinmakroarray	89
Tab. 24	Frequenz häufig detektierter Autoantikörper in Gliomen	90
Tab. 25	Überblick über die Verteilung der AUC-Werte für die Klassifikation von Gliomen.....	90
Tab. 26	Klassifikations-relevante Antigene in Gliomen	91
Tab. 27	Veröffentlichte Microarray-Studien bei Meningeomen	99
Tab. 28	Relevante Antigene für die vier durchgeführten Klassifikationen.....	108
Tab. 29	Vergleich der erreichten Klassifikationsresultate mit in der Literatur beschriebenen Ergebnissen für andere Krebsarten.....	111

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematische Darstellung der Durchführung des serologischen Spotassays.....	23
Abb. 2	Beispiele für die Auswertung der Microarrays mittels <i>Running Sum</i>	38
Abb. 3	Informationsgehalt Meningeom-assoziiierter Antigene	47
Abb. 4	Klassifikation von Meningeomen mittels serologischem Spotassay	49
Abb. 5	Klassifikation von WHO I Meningeomen mittels serologischem Spotassay.....	50
Abb. 6	mRNA Expression Meningeom-assoziiierter Antigene in Abhängigkeit von der Seroreaktivität	62
Abb. 7	Vergleich der mRNA Expression seronegativer und seropositiver Antigene in WHO I Meningeomen	63
Abb. 8	Veränderung der Genexpression in Meningeomen in Abhängigkeit von der Seroreaktivität	65
Abb. 9	Vorgehensweise zur Identifizierung weiterer Meningeom-assoziiierter Antigene	69
Abb. 10	Seroreaktivität gegenüber den Klonen ENO1 und SORBS2.	77
Abb. 11	Klassifikation von Gliomen mittels serologischem Spotassay.....	84
Abb. 12	Informationsgehalt Gliom-assoziiierter Antigene	85
Abb. 13	Seroreaktivität gegenüber dem Klon VIM	92

Abkürzungsverzeichnis

AUC	<i>Area Under the ROC-curve</i>
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
°C	Grad Celsius
CBTRUS	<i>Central Brain Tumor Registry of the United States</i>
cDNA	copy DNA
CIDB	<i>Cancer Immunome Database</i>
CIDP	chronisch inflammatorische, demyelinisierende Polyradikuloneuropathie
cm	Zentimeter
cRNA	copy RNA
Cy5	Cyanin5
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
Fc-Region	konstante Region von Antikörpern
g	Beschleunigungskraft
g	Gramm
GBM	<i>Glioblastoma Multiforme</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
GSEA	<i>Gene Set Enrichment Analysis</i>
GTC	Guanidinisothiocyanat
h	Stunde
H2Odd	bidestilliertes Wasser
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LB	Luria-Bertani Medium
Log	dekadische Logarithmus
M	Molar

MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MI	Mutual Information
min	Minute
µg	Microgramm
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
nm	nanometer
OD	optische Dichte
pfu	<i>Plaque Forming Unit</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonukleasen
ROC	<i>Receiver Operator Characteristics Curve</i>
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
RZPD	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
sec	Sekunde
SePACS	<i>Seroreactivity Profile Classification Service</i>
SEREX	<i>Serological identification of recombinantly expressed antigens</i>
SERPA	<i>Serological Proteome Analysis</i>
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ü. N.	über Nacht
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
w / v	<i>weight / volume</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
ZNS	Zentralnervensystem

Einleitung

1.1 Gliome

Gliome sind mit einer Inzidenz von ca. 6 neuen Fällen pro 100.000 Einwohner und Jahr die häufigsten primären Hirntumore. Sie entstehen aus den Stützzellen des Gehirns, den Gliazellen. Anhand ihres zellulären Ursprungs werden die Gliome unterteilt, wobei die Astrozytome den größten Anteil stellen, gefolgt von den Oligodendrogliomen [CBTRUS, 2008]. Die Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organisation*, WHO) teilt die Astrozytome nach ihrer Dignität im histologischen Bild in vier Grade ein [Louis et al., 2007].

Astrozytome des WHO-Grades I, die pilozytischen Astrozytome, manifestieren sich vorrangig in der Kindheit und Jugend. Bei Patienten im Alter von 0 bis 14 Jahren stellen sie 21 % aller Tumoren des Zentralnervensystems und insgesamt ca. 5 - 6 % aller Gliome. Pilozytische Astrozytome sind in der Regel gut umschriebene, langsam wachsende Tumore ohne Geschlechterpräferenz und gelten als eigenständige Entität. Eine genetische Prädisposition liegt bei Patienten mit Neurofibromatose 1 vor, einer Krankheit, die auf einem Defekt des NF1-Gens basiert. Bei ca. 15 % der Patienten mit Neurofibromatose 1 manifestieren sich im Laufe ihrer Erkrankung pilozytische Astrozytome. In den meisten Fällen sind pilozytische Astrozytome durch Resektion des Tumors kurativ therapierbar. Eine Progression zu höhergradigen Astrozytomen ist selten, weshalb die Prognose für diese Patienten sehr gut ist. In der größten, epidemiologischen Studie über Gliome innerhalb einer europäischen Population (Kanton Zürich) lag die 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten mit pilozytischen Astrozytomen nach maximaler Resektion bei 100 %, die 10-Jahres-Überlebensrate noch bei 96 % [Ohgaki und Kleihues, 2005].

Astrozytome des WHO-Grades II oder diffuse Astrozytome stellen ca. 10 - 15 % aller astrozytären Tumoren. Der Manifestationsschwerpunkt liegt zwischen dem 20. und 45. Lebensjahr. Das Durchschnittsalter der Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose liegt bei 34 Jahren, wobei Männer etwas häufiger betroffen sind als Frauen. Diffuse Astrozytome zeigen einen hohen Grad an zellulärer Differenzierung, nukleäre Atypien sowie ein infiltrierendes Wachstum in das sie umgebende Hirnparenchym. Die Überlebenszeit der Patienten ist individuell sehr variabel und beträgt im Durchschnitt 6 - 8 Jahre nach Resektion des Primärtumors. In der zuvor genannten epidemiologischen Studie lag die 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit diffusen Astrozytomen bei 56 % [Ohgaki und Kleihues, 2005]. Diffuse Astrozytome zeigen eine Tendenz zur malignen Progression zu anaplastischen

Astrozytomen und Glioblastomen etwa 4 - 5 Jahre nach dem Auftreten des diffusen Astrozytoms, wobei auch dieses progressionsfreie Intervall großen individuellen Schwankungen unterliegt.

Astrozytome des WHO-Grades III, die anaplastischen Astrozytome, nehmen eine intermediäre Stellung zwischen den Grad II und Grad IV Astrozytomen ein. Das Durchschnittsalter der Patienten bei Diagnose liegt je nach Studie zwischen 45 und 51 Jahren. Die mittlere Überlebenszeit von Patienten mit anaplastischen Astrozytomen beträgt etwa 19 Monate nach Diagnose und ist vor allem von der progressionsfreien Überlebenszeit abhängig, welche auch bei den anaplastischen Astrozytomen individuell sehr variabel ist (im Mittel zwei Jahre). Auch bei anaplastischen Astrozytomen sind Männer etwas häufiger betroffen als Frauen. Die 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten liegt bei nur 11 % [Ohgaki und Kleihues, 2005; Louis et al., 2007].

Astrozytome des WHO-Grades IV, die Glioblastome (Glioblastoma multiforme, GBM), sind die häufigsten primären Hirntumore des Menschen. Sie stellen ca. 12 - 15 % aller intrakraniellen Neoplasien und ca. 50 - 75 % aller astrozytären Tumore. Glioblastome sind hochmaligne Tumore mit einer starken Tendenz zur Rezidivbildung auch nach radikaler Resektion des Primärtumors. Glioblastome manifestieren sich in der Regel zwischen dem 45. und 75. Lebensjahr, das Durchschnittsalter der Patienten bei Diagnose liegt bei 61 Jahren. Der klinische Verlauf von Patienten mit Glioblastomen ist sehr kurz, weniger als die Hälfte der Patienten leben länger als ein Jahr. In der Studie aus dem Kanton Zürich wird eine 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten mit Glioblastomen von nur 1,2 % angegeben [Ohgaki und Kleihues, 2005]. Man unterscheidet zwei Entitäten bei Glioblastomen: Primäre oder *de-novo* Glioblastome können sich innerhalb von wenigen Monaten ohne eine vorherige bekannte prämaligne Läsion bilden und stellen etwa 90 % der Glioblastome. Sekundäre Glioblastome hingegen sind seltener und durch maligne Progression aus niedergradigen Astrozytomen entstanden. Das Durchschnittsalter der Patienten mit primären GBMs liegt bei 62 Jahren, das der Patienten mit sekundären GBMs bei 45 Jahren [Ohgaki und Kleihues, 2005]. Auch die durchschnittlichen Überlebenszeiten von Patienten mit primären und sekundären GBMs unterscheiden sich stark. Während Patienten mit primären GBMs im Schnitt eine Überlebenszeit von nur 4,7 Monaten haben, liegt diese bei Patienten mit sekundären GBMs im Schnitt bei 7,8 Monaten. Dies ist weniger auf eine unterschiedliche Aggressivität der Tumoren zurückzuführen, als vielmehr auf das höhere Alter der Patienten mit primären GBMs.

Während pilozytische Astrozytome einen überwiegend normalen Karyotyp aufweisen, nimmt die Zahl der genetischen Veränderungen mit dem Tumorgrad zu. Glioblastome haben meist einen stark veränderten aneuploiden Karyotyp. Zu den genetischen Veränderungen, die bei der Progression von diffusen Astrozytomen zu sekundären Glioblastomen beobachtet werden, zählen u. a. Verluste der Heterozygotie auf den Chromosomenarmen 10q, 22q und 19q [Ohgaki und Kleihues, 2007]. Als frühes Ereignis in der Tumorgenese von Astrozytomen wird eine Mutation im p53-Gen gesehen, welche in ca. 50 - 65 % der diffusen und anaplastischen Astrozytome sowie der sekundären Glioblastome zu finden ist. Bei den primären GBMs spielt die Mutation von p53 eine geringere Rolle, hier ist nur in ca. 28 % der Fälle eine Mutation des Gens zu beobachten. Auch Mutationen in weiteren Genen sowie Genamplifikationen sind bekannt.

Abgesehen von den pilozytischen Astrozytomen zeigen alle Astrozytome ein ausgeprägt invasives Wachstum in das umgebende Hirnparenchym und sind daher meist nicht vollständig resezierbar. Daher ist die Therapie von Gliomen, mit Ausnahme der pilozytischen Astrozytomen, eine rein palliative. Als derzeitige Standardtherapie bei Gliomen gilt eine möglichst radikale Resektion mit adjuvanter postoperativer Radio- und/oder Chemotherapie. Positive Prädiktoren für eine längere Überlebenszeit bei Gliompatienten sind ein junges Patientenalter und ein hoher Karnofsky-Index. Auch Patienten mit Oligoastrozytomen, d. h. Gliomen mit sowohl astrozytärer als auch oligodendroglialer Komponente, sowie Patienten mit Oligodendrogliomen zeigen eine längere Überlebenszeit bei gleichem Tumorgrad als Patienten mit reinen Astrozytomen. Die Diagnose von Gliomen erfolgt meist nach Auftreten von Symptomen bei den betroffenen Patienten durch bildgebende Verfahren und histomorphologische Charakterisierung nach Biopsie. Gliome zeigen eine große zelluläre Heterogenität. Die Tumormasse eines Glioms setzt sich aus verschiedenen Arealen mit Zellen unterschiedlichen Karyotyps und Proliferationsverhaltens zusammen. Die Überlebenszeiten v. a. der Patienten mit Glioblastomen sind mit wenigen Wochen bis mehrere Jahre nach Resektion sehr variabel. Der Grund für das Auftreten von Langzeitüberlebenden ist nicht bekannt. Eine neuere Studie aus England, welche ein mathematisches Modell des Wachstums von Glioblastomen aufgestellt hat, postulierte, dass die langzeitüberlebenden Glioblastompatienten vielmehr das glückliche Ende („*lucky tail*“) einer statistischen unimodalen Verteilung darstellen, als dass es sich hierbei um eine getrennte Subpopulation von Patienten handele [Kirkby et al., 2007]. Es gibt auch nur wenige molekulare Faktoren, welche neben den allgemeinen Prädiktoren wie Zeitpunkt und Radikalität der Resektion eine prognostische Relevanz haben.

Trotz der vielen neuen Erkenntnisse der letzten Jahre über die Entstehung von Gliomen und zugrunde liegende genetische Faktoren gibt es zurzeit nur wenige klinische Studien, welche dieses Wissen in eine zielgerichtete Therapie von Gliompatienten einfließen lassen. Solche Therapieansätze beinhalten u. a. die Wiederherstellung der normalen p53-Genexpression in Gliomzellen durch Infektion der Zellen mit einem p53-produzierenden Adenovirus, die spezifische Lyse von Gliomzellen durch modifizierte, onkolytische Herpes-simplex-Viren oder die Induktion einer Immunantwort gegen die Gliomzellen z. B. durch Vakzinierung der Patienten mit autologen, dendritischen Zellen, die zuvor mit Gliomzell-Lysat aktiviert wurden [diskutiert bei Selznick et al., 2008]. Einige dieser Therapieversuche zeigen erste vielversprechende Ergebnisse, bis zu einer klinischen Anwendung werden jedoch noch Jahre vergehen. Ein wichtiger Punkt ist hierbei, dass diese Therapien meist nur für eine Subgruppe von Gliompatienten anwendbar sind, z. B. macht eine Wiederherstellung der normalen p53-Expression nur Sinn in der Subgruppe von Patienten, deren Tumore eine Mutation im p53-Gen tragen bzw. deren p53-Expression in den Tumoren vermindert ist.

1.2 Meningeome

Meningeome entstehen aus den Zellen der weichen Hirnhaut (Arachnoidea mater), welche Gehirn und Rückenmark umgibt. Sie sind mit 24 - 30 % aller primären Hirntumoren nach den Gliomen die zweithäufigsten Hirntumore. Meningeome sind in der Regel benigne, langsam wachsende und gut umschriebene Tumore mit einer jährlichen Inzidenz von etwa 5 neuen Fällen pro 100.000 Einwohner [CBTRUS, 2008]. Frauen sind wesentlich häufiger betroffen als Männer. Eine genetische Prädisposition für die Entwicklung von Meningeomen liegt bei Patienten mit Neurofibromatose 2 (NF2) vor. Das für diese Krankheit verantwortliche NF2-Gen ist in bis zu 60 % aller sporadischen Meningeome mutiert. Es gibt je nach dominierender Zellart verschiedene histomorphologische Subtypen von Meningeomen, u. a. meningotheliale, fibroblastische, syncytiale oder sekretorische Meningeome.

Die WHO teilt die Meningeome nach ihrer Dignität in drei Grade ein [Louis et al., 2007]. WHO-Grad I oder *common-type* Meningeome sind mit ca. 90 % die häufigsten Meningeome. Sie sind in der Regel langsam wachsend und zeigen nur eine geringe Tendenz zur malignen Entartung oder zur Rezidivbildung. Sie manifestieren sich in der Regel in der 6. und 7. Lebensdekade, wobei Frauen etwa im Verhältnis 2:1 häufiger betroffen sind. Gerade durch ihr langsames Wachstum bleiben Meningeome lange Zeit klinisch unauffällig. So rufen Meningeome erst spät Symptome durch Steigerung des intrakraniellen Drucks bzw. durch Verdrängung von gesundem Hirngewebe hervor. In einer Studie wurden bei 1,4 % der durchgeführten Routine-Autopsieuntersuchungen noch nicht diagnostizierte Meningeome gefunden [Rausing et al., 1970].

WHO-Grad II oder atypische Meningeome machen ca. 4,7 - 7,2 % der Meningeome aus und nehmen eine intermediäre Stellung zwischen den Grad I und Grad III Meningeomen ein. Sie haben ein erhöhtes Risiko für eine Rezidivbildung.

WHO-Grad III oder anaplastische Meningeome, welche zu den malignen Hirntumoren gezählt werden, machen nur ca. 1,0 - 2,8 % aller Meningeome aus. Sie sind schnell, zum Teil auch invasiv, wachsende Tumore mit einer mittleren Überlebenszeit der Patienten von weniger als zwei Jahren nach Diagnose.

Meningeome der WHO-Grade II und III treten gehäuft bei Männern oder im jungen Lebensalter auf, während WHO-Grad I Meningeome sich vorwiegend bei Frauen in der 6. und 7. Lebensdekade manifestieren. Die häufigste chromosomale Aberration ist ein vollständiger oder teilweiser Verlust von Chromosom 22. Mit steigendem WHO-Grad nimmt auch die Komplexität der chromosomalen Aberrationen zu. Höhergradige Meningeome zeigen oft Deletionen auf den Chromosomenarmen 1p, 6q, 9p, 10p, 10q, 14q und 18q sowie Gewinne auf den Chromosomenarmen 1q, 9q, 12q, 15q, 17q und 20q [Perry et al., 2004; Louis et al., 2007].

In Meningeomen sind bereits Veränderungen in einigen Signalwegen beschrieben worden, u. a. Veränderungen im Map-Kinase-, Wnt- und Notch-Signalweg [Mawrin et al., 2005; Howng et al., 2002; Cuevas et al., 2005]. Es gibt wenige Microarray-Studien zu Meningeomen, welche jeweils nur ein geringes Set an Genen [Watson et al., 2002; Wrobel et al., 2005], oder die Genexpression ohne Beachtung des Tumorgrades untersucht haben [Fathallah-Shaykh et al., 2003]. Eine Studie konnte die Meningeome aufgrund ihres Expressionsmusters in nur zwei Subklassen unterteilen [Carvalho et al., 2007].

Die Therapie von Meningeomen sieht eine radikale Resektion des Tumors vor, welche in der Regel kurativ ist. Eine adjuvante Chemo- bzw. Radiotherapie ist nicht angezeigt. Die Rezidivraten sind v. a. für die *common-type* Meningeome mit 20 % innerhalb von 20 Jahren sehr gering [Jääskeläinen, 1986], steigen allerdings mit steigendem Tumorgrad. Das Ausmaß der Resektion, welches vor allem von der Lage des Meningeoms abhängig ist, stellt hier den bedeutendsten klinischen Faktor für die Vorhersage des weiteren Krankheitsverlaufs dar.

1.3 Tumor-assoziierte Antigene

Das Immunsystem reagiert auf unterschiedlichen Wegen auf die Bedrohung durch einen Tumor. Es kommt sowohl zu einer zellulären T-Zellantwort, als auch zu einer humoralen B-Zell-Antwort auf verschiedene Tumor-assoziierte Antigene (TAAs). Das sind im Tumor exprimierte Proteine, gegenüber denen das Immunsystem die Selbsttoleranz verloren hat. Zurzeit werden mehrere Mechanismen diskutiert, warum es bei Krebspatienten zu einer Immunantwort gegenüber körpereigenen Proteinen kommt. Dazu gehören 1) Mutationen in den codierenden Genen; 2) Überexpression von Proteinen bzw. Expression von fetalen Proteinen in adulten Geweben; 3) Veränderungen in der Faltung der Proteine; 4) Veränderungen in der posttranslationalen Modifizierung der Proteine in Krebszellen; 5) aberrante Degradierung von Proteinen in Krebszellen; 6) Veränderungen in der zellulären Lokalisation von Proteinen.

Das bekannteste Beispiel für ein Tumor-assoziiertes Antigen ist das Protein p53. Dieses Protein ist ein multifunktionseller Transkriptionsfaktor, welcher durch Regulation der Expression von Genen der Zellzykluskontrolle, Apoptose, DNA-Reparatur oder Angiogenese das Wachstum der Tumorzellen inhibiert. Mutationen im p53-Protein sind bereits in einer Vielzahl von Krebsarten nachgewiesen worden, u. a. bei Brustkrebspatienten, und korrelierten oftmals mit einer schlechten Prognose [Oliveira et al., 2005]. Bereits 1979 zeigte die Arbeitsgruppe um DeLeo das Vorhandensein von Autoantikörpern gegen p53 in Mäusen [DeLeo et al., 1979]. Autoantikörper gegen p53 wurden, mit Frequenzen von 4 - 30 %, ebenfalls in den Seren einer Reihe von Patienten mit verschiedenen Tumoren nachgewiesen. Es wurde eine Korrelation zwischen dem Auftreten von p53-Autoantikörpern und Mutationen im p53-Protein bzw. der Akkumulation von p53 im Zellkern gezeigt [Soussi, 2000]. Da die immunogenen Epitope auf den stark phosphorylierten N- und C-Terminus des Proteins beschränkt wurden, die Mutation selbst allerdings im zentralen Proteinbereich liegt, wird darüber diskutiert, ob hier die durch die Mutation veränderte Aminosäuresequenz des Proteins die Ursache der Autoimmunantwort ist oder eher die durch die stark verlängerte Halbwertszeit bedingte Akkumulation des mutierten p53 im Zellkern.

Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Autoantikörpern in Krebspatienten und der Überexpression des entsprechenden Antigens im Tumor wurde für das Antigen NY-ESO-1 gezeigt. Dieses Antigen zählt zu den *Cancer-Testis* Antigenen. Das sind Proteine, welche in

der Embryonalentwicklung eine Rolle spielen, allerdings im adulten Organismus nur noch in Hoden bzw. Ovarien und in verschiedenen Tumoren exprimiert werden. Das Antigen NY-ESO-1 wurde durch die sogenannte SEREX-Methode als Tumor-assoziiertes Antigen in Plattenepithelkarzinomen der Speiseröhre identifiziert und seine Expression in verschiedenen Krebsarten, u. a. Brustkrebs, Melanomen und Prostatakrebs nachgewiesen [Chen et al., 1997].

Auch falsch gefaltete Proteine können eine Immunantwort auslösen. Es wurde gezeigt, dass die durch MHC-Klasse I präsentierte Oligopeptidfragmente zum Teil aus neu synthetisierten Proteinfragmenten bestehen, welche aufgrund von Fehlern in Translation oder Faltung durch das Proteasom degradiert wurden [Schubert et al., 2000]. Durch diese Präsentation von Fragmenten intrazellulärer Proteine an der Zelloberfläche kann somit auch eine Antikörperantwort hervorgerufen werden.

Zu den Antigenen, bei denen die Immunogenität durch ein verändertes Glykosylierungsmuster hervorgerufen wird, gehört MUC1 [von Mensdorff-Pouilly et al., 2000]. Seren von Brustkrebspatienten reagierten im ELISA stärker mit einem 60 Aminosäuren großen, glykosylierten Fragment von MUC1 als mit dem unglykosylierten Peptidfragment. Veränderungen im zellulären Abbau von Proteinen können ebenso zu einer Autoantikörperantwort in Krebspatienten führen. Ein Beispiel hierfür ist das Protein Nucleophosmin, welches bei Leberkrebs bevorzugt durch GranzymB degradiert wird. Dies führt zur Entstehung eines krebsspezifischen Epitops an genau dieser GranzymB-Schnittstelle. Auch die zelluläre Lokalisation von Nucleophosmin ist in den Tumorzellen verändert. Während immunhistochemische Färbungen von Gewebeschnitten gesunder Leber eine vorwiegend zytoplasmatische Färbung aufweisen, zeigen Schnitte von Leberkarzinomen eine verstärkte nukleäre Färbung [Ulanet et al., 2003].

Während einige Autoantigene in vielen Krebspatienten unabhängig von der Art der Krebserkrankung eine Immunantwort auslösen, wie z. B. p53, so treten andere Autoantigene überwiegend nur bei einer bestimmten Krebsart auf und spiegeln deregulierte Signalwege in dieser Krebsart wider. Es wurde gezeigt, dass verschiedene Proteine des mTOR-Signalweges sowie der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur, welche bei Brustkrebspatienten verändert sind, eine Immunantwort in diesen Patienten auslösen [Fernández Madrid, 2005]. Die zunehmende Identifizierung ganzer Reihen von Tumor-assoziierten Antigenen für viele Krebsarten zeigt, dass die Forschung in den letzten Jahren vermehrt versucht, Autoantikörperprofile als Marker zur minimal-invasiven Erkennung dieser Tumore auszunutzen.

Da das Immunsystem direkt auf die Veränderungen in den Tumorzellen reagiert, können Autoantikörperprofile nicht nur zu einer sehr frühen Erkennung von Tumoren eingesetzt werden, sondern auch zur Überwachung des Therapieverlaufs, bei Regression oder auch bei Progression zu aggressiveren Tumoren bzw. beim Auftreten von Rezidiven. Trivers et al. konnten Autoantikörper gegen p53 in zwei Studien bei Risikopopulationen für Angiosarkome und Lungenkrebs sogar schon Jahre vor dem klinischen Auftreten des Tumors im Serum nachweisen [Trivers et al., 1995; Trivers et al., 1996]. Dies zeigt eine mögliche Verwendung von Autoantikörperantworten zur Überwachung von Risikogruppen, wie sie z. B. mithilfe des Prostata-spezifischen Antigens bei Prostatakrebs schon seit Jahren durchgeführt wird. Autoantikörper gegen NY-ESO1 wurden in einer Studie in 10 % der Patienten mit Neuroblastomen Grad III und IV nachgewiesen, nicht aber in Patienten mit geringer gradigen Neuroblastomen oder in Patienten in Remission [Rodolfo et al., 2003]. Dies zeigt die Möglichkeit einer Verwendung von Autoantikörpern zur Bestimmung des Malignitätsgrades vor einer invasiven Maßnahme wie z. B. einer Biopsie bzw. zur Überwachung des Krankheitsverlaufs. Autoantikörper (IgM) gegen das TA90 Antigen konnten bei Melanompatienten in 12 % der Patienten, die später ein Rezidiv entwickelten, nachgewiesen werden, aber in 62 % der Patienten die kein Rezidiv entwickelten [Litvak et al., 2004]. In diesem Fall stellt die Autoantikörperantwort einen positiv prädiktiven Faktor für den weiteren Krankheitsverlauf dar.

Es gibt verschiedene Methoden zur Identifizierung Tumor-assoziierten Antigene, u. a. die SEREX-Methode, das Phage-Display, die SERPA-Methode sowie Proteinmicroarrays. Diese werden im Folgenden kurz erläutert.

Bei der SEREX-Methode („*serological identification of recombinantly expressed antigens*“) wird eine cDNA-Expressionsbank in Bakteriophagen kloniert und exprimiert [Sahin et al., 1995]. Anschließend werden die rekombinant exprimierten Antigene auf eine Membran übertragen und mit Patientenserum inkubiert. Vorhandene Autoantikörper im Patientenserum können dann mithilfe eines sekundären Enzym-gekoppelten Antikörpers, welcher die konstante Region humaner IgGs erkennt, in einer Farbreaktion sichtbar gemacht werden. Positive Antigene können anschließend isoliert und sequenziert werden, um ihre Identität festzustellen. Dieses Verfahren wurde bereits vielfach zur Identifizierung Tumor-assoziierten Antigene eingesetzt, u. a. bei Lungen-, Leber-, Brust- und Prostatakrebs [Diesinger et al., 2002; Wang et al., 2002; Qian et al., 2005; Fosså et al., 2000]. Ursprünglich wurde die

cDNA-Bank aus dem Tumor eines Patienten angelegt und mit autologem Serum untersucht. In späteren Experimenten wurden aber auch heterologe Seren bzw. cDNA-Banken aus fetalen Geweben verwendet. Aufgrund der vielen Arbeitsgruppen, welche die SEREX-Methode anwenden, und der großen Zahl an identifizierten Tumor-assoziierten Antigenen wurde die „*Cancer Immunome Database*“ (CIDB, <http://www2.licr.org/CancerImmunomeDB/>) gegründet. In dieser Datenbank werden mit SEREX identifizierte Tumor-assoziierte Antigene gesammelt und öffentlich zugänglich gemacht. Zurzeit enthält die CIDB-Datenbank ca. 2300 immunogene Klone, welche ca. 1500 verschiedenen Tumor-assoziierten Antigenen entsprechen.

Nach erfolgreicher Identifizierung von Tumor-assoziierten Antigenen mit SEREX, können zur Feststellung der Häufigkeit der Autoantikörperreaktion in einer größeren Zahl an Tumor- und Kontrollseren auch serologische Spotassays durchgeführt werden. Hierbei werden die zuvor identifizierten positiven Phagen zusammen mit den Wirtsbakterien monoklonal auf eine mit Nährmedium beschichtete Membran aufgebracht und die Antigene exprimiert. Diese Membran kann nun, ähnlich wie bei dem ursprünglichen SEREX-Verfahren, mit Patientenserum untersucht werden. Hiermit lassen sich bereits Frequenzen von Autoantikörperreaktionen sowie auch Tumor-assoziierte Autoantikörpermuster, sogenannte Seroreaktivitätsmuster oder -profile feststellen.

Eine weitere, etwas neuere Methode zur Identifizierung von Tumor-assoziierten Antigenen ist das sogenannte Phage-Display. Hierbei werden Antigene einer Expressionsbank als Fusionsproteine mit einem Phagenkapsidprotein exprimiert, sodass die entsprechenden Proteine an der Oberfläche der Phagen fixiert sind. Nach mehreren Runden Immunpräzipitation mittels Normal- oder Kontrollseren zur Depletion von Normalantigenen bzw. mit Patientenserum mit anschließender Amplifikation der verbleibenden Phagenklone, enthält die Bank bevorzugt Phagen mit Tumor-assoziierten Antigenen. Diese Phagen werden anschließend vereinzelt, sequenziert und können dann monoklonal auf eine Glasoberfläche aufgebracht werden. Nach Inkubation mit Patientenserum können gebundene Autoantikörper analog zu konventionellen Microarray-Verfahren mithilfe Fluoreszenz-gekoppelter, sekundärer Antikörper detektiert werden. Dieses Verfahren gewinnt immer mehr Zulauf, insbesondere weil die Handhabung ähnlich der bei Microarrays ist und es mit diesem System auch möglich ist, eine große Anzahl von Seren im Hochdurchsatz auf Vorhandensein einer großen Anzahl an Autoantikörpern zu testen. Diese Methode wurde schon erfolgreich zur

Identifizierung und Frequenzermittlung Tumor-assoziiierter Antigene in verschiedenen Tumoren, u. a. Prostata-, Eierstock-, Darm- und Brustkrebs eingesetzt [Fosså et al., 2004; Chatterjee et al., 2006; Somers et al., 2002; Sioud et al., 2001].

Eine weitere Methode, die der Identifizierung von TAAs dient, ist die sogenannte SERPA-Methode („*serological proteome analysis*“). Hierbei werden Proteinlysate von Tumoren durch 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und anschließend mit autologem Patientenserum bzw. mit Kontrollserum untersucht. Proteinspots, welche spezifisch nur mit Patientenseren, nicht aber mit Kontrollseren, reaktiv sind, werden anschließend mittels Massenspektrometrie identifiziert. Diese Methode wurde bereits erfolgreich zur Identifizierung von TAAs in Brustkrebs, Pankreaskrebs und bei Leukämie verwendet [Canelle et al., 2005; Hong et al., 2004; Cui et al., 2005]. Dem Vorteil der Identifizierung von Tumor-exprimierten Volllängen-Antigenen steht der Nachteil der mäßigen Reproduzierbarkeit der 2D-Gele gegenüber. Daher eignet sich dieses Verfahren zwar zur Identifizierung einzelner TAAs, ist aber für ein Hochdurchsatz-Screening ungeeignet.

Die neueste Methode zur Feststellung von Autoantikörperprofilen stellen die Proteinmicroarrays dar. Hier werden rekombinant exprimierte, getaggte Proteine auf eine Glasoberfläche aufgebracht oder alternativ, um Probleme bei der Haltbarkeit solcher Arrays zu umgehen, die cDNA der gewünschten Proteine auf den Microarray gespottet. Die cDNA wird dann erst kurz vor der Verwendung durch Retikulozytenlysate *in situ* translatiert [Ramachandran et al., 2004]. Dies bietet vor allem den Vorteil, dass die Faltung der Proteine dem natürlichen Vorkommen in Säugerzellen entspricht.

Während sowohl das SEREX-Verfahren, als auch das SERPA-Verfahren sich eher zur Identifizierung von Tumor-assoziierten Antigenen eignen, können mit dem Phage-Display-Verfahren und den Proteinmicroarrays auch Hochdurchsatztests durchgeführt werden. Solche Verfahren können später auch in der Diagnostik von Tumoren eingesetzt werden, z. B. zum Screening von Risikopopulationen.

Bei der Entwicklung von effektiven Tests zur Früherkennung von Tumoren muss vor allem auf die Spezifität und Sensitivität des Tests geachtet werden. Eine Sensitivität von 100 % bedeutet, dass der Test zuverlässig alle Krebspatienten in der getesteten Population korrekt erkennt, also keine falsch-negativen Ergebnisse liefert. Eine Spezifität von 100 % bedeutet,

dass der Test zuverlässig alle gesunden Probanden auch als gesund identifiziert, also keine falsch-positiven Ergebnisse liefert. Ein kosteneffizienter Screeningtest, welcher als Vorsorgeuntersuchung für eine große Population konzipiert ist, sollte möglichst wenig falsch-positive Ergebnisse, welche weitere Untersuchungen notwendig machen würden, liefern. Allerdings sollte auch die Zahl der falsch-negativen Ergebnisse möglichst gering gehalten werden. Daher sollten sowohl Spezifität als auch Sensitivität möglichst nahe 100 % liegen. Dies ist mit einzelnen TAAs als Marker nicht realistisch, da viele TAAs zwar spezifisch für eine Krebserkrankung sind, allerdings die Frequenz einer Autoantikörperantwort gegenüber den TAAs doch eher gering ist. Das Auftreten von Autoantikörpern gegen p53 ist zwar sehr spezifisch für eine Reihe von Krebserkrankungen, allerdings liegt die Frequenz der Autoantikörperantwort in den Patienten nur zwischen 4 und 30 % [Soussi, 2000].

Um eine derart hohe Spezifität und Sensitivität zu gewährleisten, müssen Plattformen entwickelt werden, auf denen eine Vielzahl von Antigenen gleichzeitig und mit einem hohen Durchsatz an Seren analysiert werden können. Durch die kombinierte Verwendung vieler verschiedener Autoantikörper als Marker für eine Krebserkrankung, also die Erstellung von Seroreaktivitätsprofilen, konnten bereits erste, vielversprechende Ergebnisse in der experimentellen Tumordiagnostik erreicht werden. Die Arbeitsgruppe um Wang et al. konnte mithilfe eines Phage-Display-Detektors mit nur 22 Autoantigenen Patienten mit Prostatakrebs von einer Kontrollgruppe mit einer Spezifität von 88,2 % und einer Sensitivität von 81,6 % trennen [Wang et al., 2005]. Mit derselben Methode erreichten Chen et al. ebenfalls mit 22 Autoantigenen bei der Trennung von Patienten mit Adenokarzinomen der Lunge und gesunden Kontrollen eine Spezifität von 86 % und eine Sensitivität von 85 % [Chen et al., 2007]. Seren von Patienten mit nicht-kleinzelligen Lungentumoren konnten sogar mit einer Spezifität von 95 % und einer Sensitivität von 90 % unterschieden werden [Zhong et al., 2005].

1.4 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Möglichkeiten einer minimal-invasiven Erkennung von Hirntumoren, im speziellen von Gliomen und Meningeomen, auf Basis von Seroreaktivitätsmustern auszuloten. Hirntumore stellen aufgrund ihrer Lage eine Herausforderung in dieser Hinsicht dar. Durch ihre Lokalisation im Gehirn liegen die Gliome in einem immun-privilegierten Bereich, der eine Autoantikörperantwort gegen den Tumor bedingt durch die Blut-Hirn-Schranke weitgehend einschränkt. Des Weiteren können selbst kleine Hirntumore bereits lebensbedrohlich sein, v. a. wenn sie aufgrund ihrer Lokalisation inoperabel sind. Ferner erzeugen Hirntumore in der Regel meist sehr spät Symptome, welche durch das Ansteigen des intrakraniellen Drucks oder den Druck auf das angrenzende Hirnparenchym verursacht werden. Bei den Gliomen kommt erschwerend hinzu, dass diese infiltrierend wachsen. Je länger ein Gliom nicht erkannt wird und somit ungehindert wachsen kann, desto geringer sind die Chancen, durch eine Operation den Großteil des Tumors entfernen zu können. Bei Glioblastomen wird die Problematik aufgrund des sehr kurzen klinischen Verlaufs und der infausten Prognose noch deutlicher. Da Gliome auf zellulärer Ebene sehr heterogen sind, d. h. dass sich innerhalb desselben Glioms viele verschiedene Areale mit Zellen unterschiedlichen Proliferationsverhaltens und Karyotyps befinden, sollten zunächst am Beispiel der im Vergleich zu den Gliomen sehr homogenen Meningeome die Möglichkeiten einer minimal-invasiven Identifizierung getestet werden.

Die Arbeitsgruppe um Comtesse et al. beschrieb bereits eine komplexe Immunantwort bei Meningeompatienten [Comtesse et al., 2005]. Sie identifizierte 57 Meningeom-assoziierte Antigene mithilfe des SEREX-Verfahrens und untersuchte die Häufigkeit einer Autoimmunantwort gegenüber diesen Antigenen an einer geringen Zahl von Meningeompatienten und gesunden Kontrollen. Aufbauend auf dieser Arbeit soll eine große Anzahl von Meningeompatienten und gesunden Kontrollprobanden auf das Vorhandensein von Autoantikörpern gegenüber den bereits durch Comtesse et al. beschriebenen Meningeom-assoziierten Antigenen mithilfe des serologischen Spotassays untersucht werden. So soll ein Seroreaktivitätsmuster für Meningeome aufgestellt werden, das sich von dem, welches in den gesunden Kontrollprobanden zu beobachten ist, statistisch unterscheiden lässt. Diese Unterscheidung mit statistischen Mitteln wird im Folgenden als Klassifikation, Trennung oder Differenzierung bezeichnet. Ebenso sollen die möglichen Ursachen für eine Immunogenität von Tumor-exprimierten Proteinen am Beispiel der Meningeome näher untersucht werden.

Hierfür wird zunächst die Expression in Meningeomen mithilfe von cDNA-Microarrays untersucht. Anhand der Daten sollen anschließend deregulierte Signalwege in Meningeomen identifiziert und die Expression der Meningeom-assoziierten Antigene in Zusammenhang mit der Immunogenität der Antigene in autologen Patienten untersucht werden.

Nachdem die grundsätzliche Möglichkeit einer minimal-invasiven Identifizierung von Meningeompatienten aufgrund von Seroreaktivitätsmustern nachgewiesen werden konnte, sollen weitere Meningeom-assoziierte Antigene identifiziert werden, welche eine solche indirekte Erkennung für Meningeome weiter verbessern können. Hierfür soll eine cDNA-Expressionsbank verwendet werden, welche am Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung bereits etabliert ist. Nach erfolgreicher Identifizierung von weiteren Meningeom-assoziierten Antigenen, sollen diese zusammen mit anderen Tumor-assoziierten Antigenen zu einem Proteinmakroarray zusammengeführt werden, welcher anschließend als weitere Plattform für eine Erkennung der Meningeome auf Basis der Seroreaktivität dienen soll.

Die Erkenntnisse, welche aus den Untersuchungen des Modellsystems Meningeome als benignem, homogenem Hirntumor gezogen werden, sollen anschließend auf die malignen, heterogenen Gliome übertragen werden und auch hier die Möglichkeit einer minimal-invasiven Identifizierung der Gliompatienten untersucht werden. Die Arbeitsgruppe um Fischer et al. identifizierte bereits 12 Gliom-assoziierte Antigene [Fischer et al., 2001; Struss et al., 2001; unveröffentlichte Daten]. Diese Antigene sollen in der vorliegenden Arbeit zusammen mit ausgewählten Antigenen aus der Meningeomuntersuchung ebenfalls mithilfe eines serologischen Spotassays zur Erstellung eines Seroreaktivitätsmusters für Gliome eingesetzt werden. Insbesondere soll in dieser Untersuchung durch Einsatz nicht nur von gesunden Kontrollen, sondern auch von diversen Kontrollgruppen mit verschiedenen tumorösen und nicht-tumorösen ZNS-Erkrankungen, die Möglichkeiten einer serologischen Differenzierung von Gliompatienten und diesen Kontrollpatienten analysiert werden. Daneben sollen durch Verwendung der bereits oben angesprochenen cDNA-Expressionsbank weitere Gliom-assoziierte Antigene identifiziert werden und diese für die Erstellung eines noch komplexeren Seroreaktivitätsmusters für Gliome verwendet werden.

Diese Arbeit soll die grundlegende Verwendbarkeit von Seroreaktivitätsmustern bei der minimal-invasiven Identifizierung von Gliom- und Meningeompatienten nachweisen. Damit

könnte eine Grundlage für weitere Untersuchungen in Richtung einer Früherkennung von Tumoren oder einer Unterscheidung verschiedener Tumortypen geschaffen werden. Ebenso könnte das Seroreaktivitätsmuster mit anderen klinischen Parametern korreliert werden, wie z. B. der Überlebenszeit oder das Ansprechen auf verschiedene Therapieschemata.

Material und Methoden

2.1 Tumormaterial und Seren

Die Seren der Tumorpatienten (Meningeome, Gliome, Hypophysenadenome, Akustikusneurinome und intrakranielle Metastasen) sowie das Tumormaterial der Meningeome wurden von der Abteilung für Neurochirurgie (Prof. Steudel) zur Verfügung gestellt. Die Seren der Patienten mit neurologischen Erkrankungen (Multiple Sklerose, chronisch inflammatorische, demyelinisierende Polyradikuloneuropathie (CIDP), Kopfschmerzen) stammen aus der Abteilung für Neurologie (Prof. Fassbender). Die Seren der gesunden Kontrollgruppe wurden am Institut für klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin entnommen. Die Seren wurden aus Serumgel-Monovetten gewonnen und bei - 70 °C gelagert. Die Tumorproben der Meningeompatienten wurden unmittelbar nach der Operation in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei - 70 °C gelagert.

2.2 Seroreaktivität mittels serologischem Spotassay

Die Arbeitsgruppen Heckel et al. und Comtesse et al. haben in früheren Studien Meningeom-assoziierte Antigene mithilfe des SEREX-Verfahrens identifiziert [Heckel et al., 1998; Comtesse et al., 1999; Comtesse et al., 2002]. Des Weiteren wurden bereits erste Studien zur Häufigkeit der Autoantikörperreaktion in einer kleinen Gruppe von Meningeompatienten und gesunden Kontrollpersonen durchgeführt [Comtesse et al., 2005]. In der vorliegenden Arbeit wurden Seren von weiteren Meningeompatienten und Kontrollprobanden auf Reaktivität gegenüber Meningeom-assoziierten Antigenen untersucht. Es wurden 69 Seren von Meningeompatienten sowie 66 Seren von gesunden Probanden mithilfe des serologischen Spotassays auf Reaktivität gegenüber 57 Meningeom-assoziierten Antigenen untersucht und die Ergebnisse mit den bereits veröffentlichten von Comtesse et al. zusammengefasst. Tabelle 1 enthält eine Übersicht über die Anzahl der Patienten, Durchschnittsalter und Geschlechterverteilung der untersuchten Patientengruppen. Eine Übersicht über die 57 Meningeom-assoziierten Antigene mit Angaben über zelluläre Lokalisation, Funktion und Beteiligung an Signalwegen ist, soweit bekannt, in Tabelle A im Anhang beigefügt.

Tab. 1: Übersicht über die im serologischen Spotassay verwendeten Seren zur Differenzierung von Meningeomen

	Anzahl Seren	Durchschnittsalter (Jahren)	Verhältnis w:m
Meningeome	93	60,5	2,2:1
WHO I	40	59,4	3:1
WHO II	27	60,1	4,4:1
WHO III	26	62,7	1:1,2
Gesunde Kontrollen	90	36,9	1:1,6

w = weiblich, m = männlich

Die Arbeitsgruppen Struss et al. und Fischer et al. haben bereits Gliom-assoziierte Antigene mithilfe des SEREX-Verfahrens identifiziert [Struss et al., 2001; Fischer et al., 2001; unveröffentlichte Daten]. Eine Übersicht zu diesen Antigenen sowie deren zelluläre Funktion und Lokalisation befindet sich in Tabelle A im Anhang. Es wurde ein Panel aus 35 Antigenen zusammengestellt, welches neben 12 Gliom-assoziierten Antigenen noch 23 weitere Tumor-assoziierte Antigene enthält. Zur Bestimmung der Häufigkeit einer Immunantwort gegen diese Antigene wurde ein serologischer Spotassay mit einer großen Zahl an Tumorseren und Kontrollseren durchgeführt. Eine Übersicht über die Patientengruppen befindet sich in Tabelle 2. Eine ausführliche Liste der im serologischen Spotassay untersuchten Patienten- und Kontrollseren findet sich im Anhang in Tabelle B.

Tab. 2: Übersicht über die im serologischen Spotassay verwendeten Seren zur Differenzierung von Gliomen

	Anzahl Seren	Durchschnittsalter (Jahren)	Verhältnis w:m
Gliome	88	49,7	1:1,7
WHO II	19	37,7	1,4:1
WHO III	12	44,1	1:4,5
WHO IV	57	54,9	1:2
Gesunde Kontrollen	82	37,0	1:1,6
Intrakranielle Tumorerkrankungen	95	55,9	1,4:1
Meningeome	35	57,3	3,3:1
Akkustikusneurinome	20	52,6	1:1
Hypophysenadenome	20	56,9	1:1
Metastasen	20	55,9	1:1,5
Neurologische Erkrankungen	60	44,9	1,1:1
CIDP	20	55,2	1:4
Multiple Sklerose	20	43,6	2,2:1
Kopfschmerzen	20	36,6	1,6:1

w = weiblich, m = männlich

Es wurden Seren von Tumorpatienten und von Patienten mit anderen Erkrankungen des ZNS sowie von gesunden Kontrollprobanden auf ihre Reaktivität gegenüber den Tumor-assoziierten Antigenen analysiert. Insgesamt wurden Seren von 88 Gliompatienten, 82 gesunden Kontrollprobanden, je 20 Patienten mit anderen tumorösen Erkrankungen des ZNS

(Hypophysenadenom, Akustikusneurinom, intrakranielle Metastase eines nicht-ZNS Tumors), 35 Meningeompatienten sowie je 20 Patienten mit nicht-tumorösen, neurologischen Erkrankungen (Multiple Sklerose, chronisch inflammatorische, demyelinisierende Polyradikuloneuropathie (CIDP), Kopfschmerzen) auf Vorhandensein von Autoantikörpern gegenüber den 35 untersuchten Antigenen getestet.

Im Anschluss wurde mithilfe von statistischen Auswerteverfahren versucht, die Seren von Meningeompatienten von den Seren der gesunden Kontrollgruppe bzw. die Seren von Gliompatienten von den Seren der anderen Kontrollgruppen anhand ihrer Seroreaktivitätsmuster zu unterscheiden.

2.2.1 Serumpräabsorption

Da humane Seren *per se* über ein großes Repertoire an Antikörpern gegen bakterielle und virale Antigene verfügen, müssen diese Antikörper zur Vermeidung von falsch-positiven Ergebnissen und hohem Hintergrund zunächst aus den zu testenden Seren entfernt werden. Zu diesem Zweck wurde eine Serumpräabsorption durchgeführt.

Hierfür wurde am Vorabend der Serumpräabsorption eine Kultur des *E.coli* Stamms XL1 Blue MRF' in LB-Medium (12,5 µg / ml Tetrazyklin, 0,2 % Maltose, 10 mM MgSO₄) angeimpft und ü. N. bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Kultur durch 10-minütige Zentrifugation bei 425 g geerntet und der Kulturüberstand verworfen. Das Pellet wurde anschließend in 10 mM MgSO₄ resuspendiert, sodass die Suspension eine optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 0,5 aufwies. Je Serum wurden vier Petrischalen (Greiner, Durchmesser 14,5 cm) mit NZCYM-Agar (Tetrazyklin 12,5 µg / ml) benötigt. Diese wurden bei 37 °C vorgewärmt. Für jede Platte wurden nun 600 µl der Bakteriensuspension mit ca. 10.000 pfu Phagen der Expressionsbank infiziert und 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 3,5 ml Top-Agar (48 °C) zu der Bakterien-Phagensuspension hinzugefügt und diese nach kurzem Mischen auf dem NZCYM-Agar luftblasenfrei verteilt. Nach Erkalten der Top-Agarschicht wurden die Platten für 4 h bei 42 °C inkubiert. In dieser Zeit kommt es zur Vermehrung der Phagen in den Bakterien. In der Folge werden die infizierten Bakterienzellen lysiert und geben die produzierten Phagen in ihre Umgebung ab, wo diese weitere Bakterien infizieren können. So entstehen schließlich die Phagenplaques im Bakterienrasen. Anschließend wurde eine zugeschnittene Nitrozellulosemembran (Protran 85,

Schleicher & Schüll), welche zuvor in 10 mM IPTG getränkt wurde, aufgelegt und für weitere 4 h bei 37 °C inkubiert. Durch das IPTG kommt es zur Induktion der Proteinexpression der in den Phagenvektor einklonierten Expressionsbank. Die Platten wurden nun ü. N. bei 4 °C gelagert. Am folgenden Tag wurden die Membranen abgenommen und 3 x 15 min in 1 x TBS-T zum Entfernen von Agarresten gewaschen. Anschließend wurden alle noch freien Bindungsstellen auf der Membran durch Inkubation in *Blocking*-Reagenz für 1 h bei RT abgeblockt. Nach weiterem 3 x 10 min Waschen in 1 x TBS wurden nun insgesamt 50 ml Serumverdünnung auf vier Membranen verteilt und 4 h bei RT und leichtem Schütteln inkubiert. Das Serum wurde zuvor 1:100 mit 1 x TBS / 0,5 % Magermilchpulver / 0,01 % Thimerosal verdünnt. Im Serum befindliche Antikörper, welche gegen bakterielle oder virale Proteine gerichtet sind, binden nun an die Membran und können so aus der Serumverdünnung entfernt werden. Die Seren wurden anschließend bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

LB-Medium (1 l):	10 g Bacto Trypton 5 g Yeast Extract 10 g NaCl
NZCYM-Agar-Platten (1 l):	23 g NZCYM 7 g Agar Tetrazyklin (Endkonzentration 12,5 µg / ml)
Top-Agar (50 ml):	0,35 g Agar 1,35 g NZCYM
1 x TBS- Puffer:	0,15 M NaCl 0,2 M Tris-Cl, pH7,5
1 x TBST- Puffer:	1 x TBS 0,5 % (w / v) Tween 20
<i>Blocking</i> -Reagenz:	1 x TBS 5 % (w / v) Milchpulver

2.2.2 Serologischer Spotassay

Die generelle Vorgehensweise eines serologischen Spotassays ist in Abbildung 1 dargestellt. Eine Übernacht-Kultur *E.coli* XL1 blue MRF' wurde zentrifugiert und das Pellet in 10 mM MgSO₄ resuspendiert, sodass die Suspension eine OD₆₀₀ von 0,5 aufwies. Zur Transfektion wurden nun 60 µl dieser Bakteriensuspension pro Well in einer 96-Well-Platte vorgelegt. Anschließend wurden von je 45 Phagenklonen und 3-mal der Phagenexpressionsbank als Negativkontrolle je 60 µl Phagensuspension (5000 pfu / µl) in jeweils zwei Wells zugegeben und gut durchmischt. Die Platte wird anschließend für 20 min bei 37 °C inkubiert. Währenddessen wurde die Membran, an welche die synthetisierten Proteine binden sollen, auf eine *Omnitray Single-Well*-Platte (NUNC) mit einem Reservoir aus NZCYM-Agarose aufgelegt und für 10 min bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurden 3,5 ml warme Top-Agarose (65 °C, 2,5 mM IPTG) auf die Membran (Protran 85, Schleicher & Schüll) gegeben und luftblasenfrei durch leichtes Anheben der Platte verteilt. Danach erkaltete die Top-Agarose auf einer ebenen Fläche. Nach Ablauf der 20 min Inkubation wurden die Phageninfizierten Bakterien mithilfe des NUNC Spotters auf die Top-Agarose aufgespottet und die Platten ü. N. bei 37 °C inkubiert. Durch das in der Top-Agarose enthaltene IPTG wird der lacZ-Promotor, unter dessen Kontrolle die einklonierte Antigensequenz steht, induziert, und es kommt zur vermehrten Bildung des entsprechenden Proteins. Dieses, wie auch alle anderen Bakterien-Proteine, binden an die Membran. Am folgenden Tag wurde die Membran abgenommen und 1 h in 1 x TBS-T gewaschen. Die Top-Agarose wurde anschließend vorsichtig abgerieben und es folgten drei 10-minütige Waschschrte in 1 x TBS-T. Die Membran wurde dann 1 h in *Blocking*-Reagenz inkubiert, wobei sich das darin enthaltene Milchpulver an alle noch freien Bindungsstellen der Membran anlagerte und so verhinderte, dass später Antikörper unspezifisch an die Membran binden konnten. Danach wurde die Membran 3 x 10 min mit 1 x TBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit der präabsorbierten 1:100 Serumverdünnung ü. N. bei 4 °C. Im Serum vorhandene Autoantikörper gegenüber Tumor-assoziierten Antigenen lagern sich hierbei entsprechend ihrer Spezifität an die Proteine auf der Membran an. Nach Entfernen des Serums wurde die Membran 3 x 10 min in 1 x TBS gewaschen. Anschließend folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Anti human IgG, mit alkalischer Phosphatase konjugiert, DIANOVA). Der Antikörper wurde zuvor in 1 x TBS / 0,5 % Milchpulver 1:5000 verdünnt und für 1 h bei RT auf die Membran gegeben. Dieser Antikörper ist gegen die Fc-Region des

menschlichen IgGs gerichtet und bindet nun an alle humanen IgG-Antikörper auf der Membran. Nach der Inkubation wurde die Membran 2 x 15 min in 1 x TBS gewaschen.

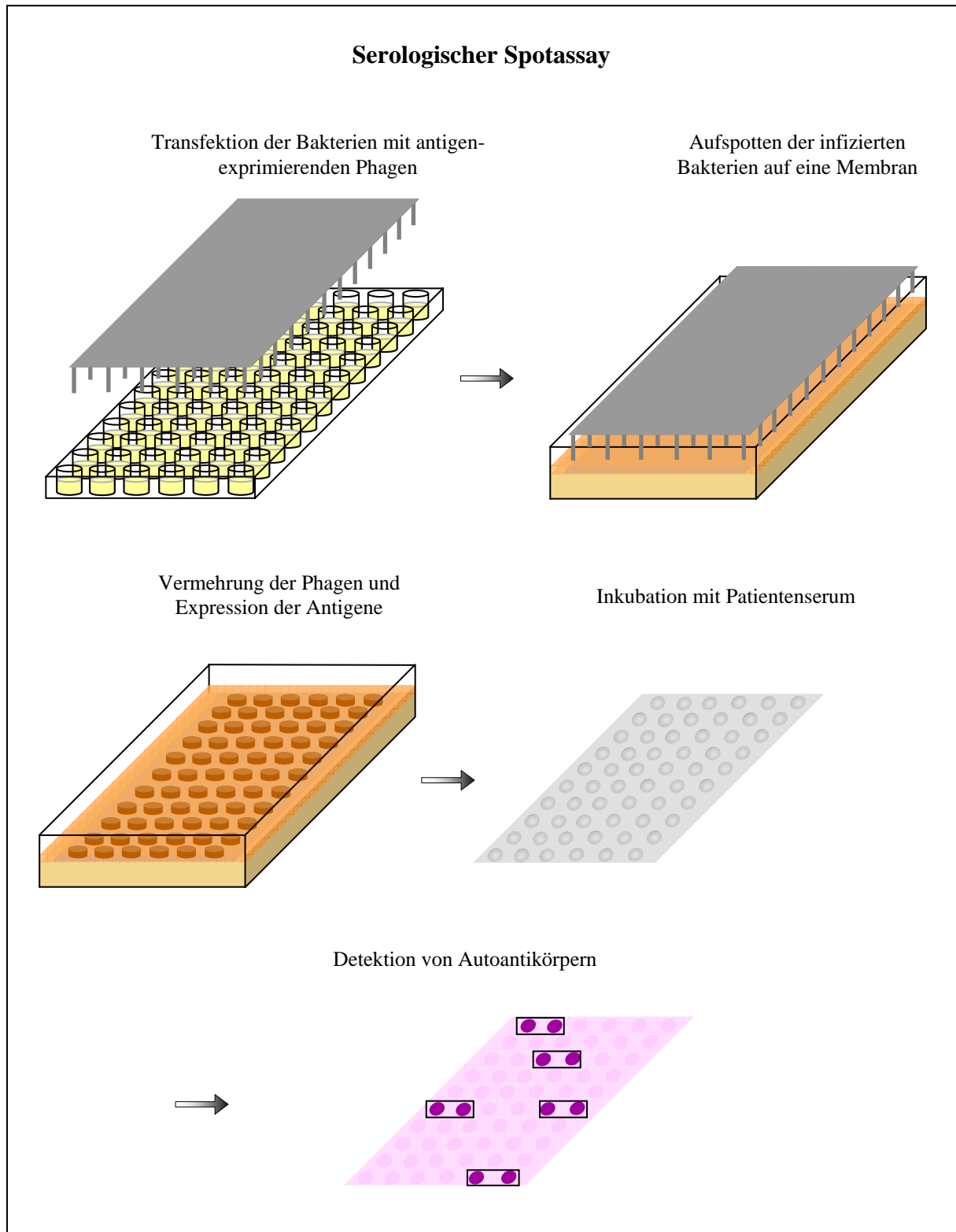


Abb. 1: Schematische Darstellung der Durchführung des serologischen Spotassays

Zur Detektion wurde nun die Detektionslösung auf die Membran gegeben und ca. 20 min im Dunkeln inkubiert. Das NBT in der Detektionslösung wird unter Beteiligung von BCIP durch die Aktivität der an den sekundären Antikörper gekoppelten alkalischen Phosphatase in einen blauen Farbstoff umgewandelt. Dieser fällt aus und auf der Membran bleibt ein blauer Spot sichtbar. Sobald die blauen Präzipitate deutlich zu erkennen waren, wurde die Membran gründlich unter fließendem Wasser abgespült und an der Luft getrocknet. Jede Membran, auf welcher alle Antigenklone in Duplikaten vorliegen, wurde zweimal mit demselben Serum als technisches Replikat inkubiert. Eine positive Seroreaktivität lag dann vor, wenn mindestens zwei von vier Antigenspots in der Farbintensität stärker waren als die Negativkontrolle.

1 x CDS:	0,1 M Tris, pH 9,5
	0,005 M MgCl ₂
	0,1 M NaCl

Detektionslösung:	1 x CDS
	5 mg / 100 ml BCIP (in 100 % DMF gelöst)
	10 mg / 100 ml NBT (in 70 % DMF gelöst)

2.3 Genexpression in Meningeomen mittels Microarray

2.3.1 RNA-Isolierung und Qualitätskontrolle

Für die Analyse der Genexpression in Meningeomen wurde aus 24 Meningeomproben und aus zwei Dura-Proben, welche als Vergleichsgewebe dienten, Gesamt-RNA isoliert. Hierfür wurde ein erbsengroßes Tumorstück in 2 ml kaltes Trizol (Invitrogen) gegeben, mithilfe eines Ultra-Turrax homogenisiert und anschließend für 5 min bei 30 °C inkubiert. Trizol ist eine einphasige Lösung des chaotropen Salzes Guanidinisothiocyanat (GTC) in Phenol, wobei GTC effektiv Proteine denaturiert. So kommt es zur Lyse der Zellen und zur Inaktivierung von Enzymen, insbesondere von RNasen. Dies ist besonders wichtig für die Qualität der RNA. Im Anschluss wurde 0,4 ml Chloroform zugegeben und zum Scheren hochmolekularer DNA für 45 sec stark gemischt. Nachdem die Lösung weitere 3 min bei 30 °C inkubiert wurde, wurde zur Phasentrennung eine Zentrifugation von 20 min bei 4 °C und 10.000 g durchgeführt. In der unteren organischen Phenol/Chloroform-Phase reichern sich durch die starke Durchmischung Proteine an, in der oberen wässrigen Phase die RNA. Die obere Phase wurde abgenommen, in ein neues Gefäß überführt und 1 Vol. 70 % Ethanol (ca. 1,5 ml)

zugegeben. Das Ethanol entzieht der RNA ihre Hydrathülle, wodurch sich ihre Lösungseigenschaften ändern. Die RNA-Moleküle aggregieren miteinander und fallen aus. Im weiteren Verlauf wurde der *RNeasy Mini-Kit* (Qiagen) verwendet und alle weiteren Schritte nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Kit basiert auf dem Prinzip einer Ionenaustauschersäule. Die RNA-Lösung wurde in 700 µl-Aliquots auf die Ionenaustauschersäule gegeben und durch Zentrifugation an die Säule gebunden. Nach einem Waschschrift mit 700 µl RW1-Puffer und zwei Waschschriften mit je 500 µl RPE-Puffer zur Entfernung von Salzen, wurde die Säule getrocknet und die RNA in 40 µl RNase-freies Wasser eluiert.

Um die Konzentration der isolierten RNA zu bestimmen, wurde diese in TE-Puffer verdünnt und im Photometer bei 260 nm die optische Dichte (OD_{260}) bestimmt. Nach Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes ist die Konzentration einer RNA-Lösung bei einer Küvettendicke von 1 cm und einer gemessenen Absorption von 1 ca. 40 µg / ml. Um Verunreinigungen der RNA mit Proteinen festzustellen, wurde auch die Ratio OD_{260} / OD_{280} gemessen und errechnet. Es wurde nur RNA verwendet, deren Ratio über 1,8 liegt.

Zur Feststellung des Grades an Degradierung der isolierten RNA wurde zusätzlich eine Gelelektrophorese in einem denaturierenden Formaldehydgel in einer horizontalen Flachbettkammer durchgeführt. Hierbei wird ausgenutzt, dass RNA durch das Zuckerphosphat-Rückgrat negativ geladen ist und somit im elektrischen Feld wandern kann. Die Gelmatrix wird von Agarose gebildet und stellt vereinfacht ein Sieb dar, durch das höhermolekulare RNA-Moleküle langsamer wandern als niedermolekulare RNA-Fragmente. Die Größe der Gelporen wird hierbei ausschließlich von der Agarosekonzentration bestimmt. Wenn RNA-Proben auf der Kathodenseite des Gels aufgetragen werden und ein elektrisches Feld angelegt wird, wandern die RNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe unterschiedlich schnell in Richtung Anode. Die RNA-Fragmente sind durch den im Ladepuffer enthaltenen Fluoreszenzfarbstoff unter UV-Licht sichtbar. Den Grad der Degradierung der RNA erkennt man am Verhältnis zwischen den Fragmenten der 18s- und 28s-RNA und allen restlichen Banden.

Zur Herstellung des Gels wurden zunächst 0,5 g Agarose in 47,3 ml 1 x MOPS-Puffer (verdünnt mit $H_2O_{dd-DEPC}$) unter Erhitzen in einer Mikrowelle gelöst und anschließend auf 55 °C abgekühlt. Des Weiteren wurden 2,7 ml 37 % Formaldehyd auf 55 °C erhitzt. Das

Formaldehyd wurde mit der Gellösung vermischt und das Gel umgehend gegossen. Die Gelkammer wurde mit 300 ml 1 x MOPS-Puffer gefüllt und das Gel nach vollständigem Erkalten eingelegt. Aufgetragen wurden hier jeweils 0,5 µl Probe mit 5 µl H₂O_{dd-DEPC} und 2 µl RNA-Ladepuffer. Der Gellauf erfolgte bei 80 V ca. 1 h. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht dokumentiert.

TE-Puffer: 0,01 M Tris-HCl , pH 8,0
 0,001 M EDTA

10 x MOPS-Puffer: 0,2 M MOPS
 0,05 M Natriumacetat
 0,1 M EDTA
 0,1 % DEPC
 pH 5,5-7

RNA-Ladepuffer (1,5 ml): 720 µl Formamid
 160 µl 10 x MOPS
 360 µl H₂O_{dd-DEPC}
 100 µl Ethidiumbromid (10 mg / ml)
 80 µl steriles Glycerol
 80 µl gesättigte Bromphenolblau-Lösung

2.3.2 Microarray-Analyse

Für diesen Versuchsteil wurde das *CodeLink Expression System* (GE Healthcare) verwendet. Es besteht aus den *Human Whole Genome* Microarrays, auf denen ca. 55.000 Oligonukleotide, welche ca. 50.000 menschliche Transkripte repräsentieren, aufgebracht sind. Zunächst wird die aus den Tumoren isolierte mRNA in cDNA umgeschrieben, wobei durch den Oligo-dT-Primer ein T7-Promotor an das 5'-Ende der entstehenden cDNA angefügt wird. Im Anschluss ist daher die In-Vitro-Translation mithilfe der T7-Polymerase möglich. Die entstehende cRNA wird durch Verwendung von biotinyliertem UTP markiert. Nach Fragmentierung der cRNA und Hybridisierung mit dem Array werden die Signale anschließend mittels Streptavidin-gekoppeltem Cy5 detektiert.

2.3.2.1 Erststrangsynthese

Der mRNA-Anteil der aus den Tumoren und dem Vergleichsmaterial gewonnenen Gesamt-RNA wurde in einem ersten Schritt in cDNA umgeschrieben. Hierbei wurde ein Oligo-dT-

Primer eingesetzt, der zusätzlich eine T7-Promotor-Sequenz am 5'-Ende enthält. Diese Sequenz dient später als Startpunkt für die In-Vitro-Transkription durch die T7-Polymerase. Zur Qualitätskontrolle wurde zu Anfang RNA aus Bakterien als interne Kontrolle zu den Proben hinzugefügt.

Ansatz Erststrangsynthese:

- 2 µg Gesamt RNA
- 2 µl Kontroll-RNA (je 2 pg araB, entF, fixB, gnd, hisB, leuB mRNA)
- 1 µl T7 Oligo-dT-Primer
- add 12 µl Nuklease-freies Wasser

Dieser Ansatz wurde zur Auflösung von Sekundärstrukturen 10 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze sofort für mindestens 3 min auf Eis abgekühlt und die restlichen Komponenten der Erststrangsynthese hinzugegeben:

- 2 µl 10 x Erststrangsynthese Puffer
- 4 µl 5 mM dNTP Mix
- 1 µl RNase-Inhibitor
- 1 µl Reverse Transkriptase

Die Erststrangsynthese erfolgte für 2 h bei 42 °C.

2.3.2.2 Zweitstrangsynthese und Aufreinigung der cDNA

In der Zweitstrangsynthese wurde zunächst der mRNA-Anteil des nach der Erststrangsynthese vorliegenden DNA / mRNA-Hybridstrangs durch die Aktivität der RNase H zum Teil abgebaut. Die entstandenen mRNA-Stücke dienten dann als Primer zur Synthese komplementärer Zweitstrang-DNA durch die DNA-Polymerase, wobei der in der Erststrangsynthese entstandene cDNA-Strang als Matrize diente.

Ansatz Zweitstrangsynthese:

- 20 µl Erststrangsyntheseansatz
- 63 µl Nuklease-freies Wasser
- 10 µl 10 x Zweitstrangsynthese Puffer
- 4 µl 15 mM dNTP-Mix
- 1 µl RNase H
- 2 µl DNA Polymerase Mix

Der Ansatz wurde 2 h bei 16 °C inkubiert. Anschließend wurde die entstandene cDNA mithilfe des *QIAquick Purification Kits* (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Dieser Kit beruht ebenfalls auf dem Prinzip der Ionenaustauschersäulen. Hierzu wurde der Zweitstrangsynthese-Ansatz in 500 µl PB-Bindepuffer aufgenommen und auf die *QIAquick*-Säule gegeben. Die cDNA bindet an die Säulenmatrix und wurde im Folgenden zweimal mit je 700 µl PE-Puffer gewaschen. Nach dem Trocknen der Säule wurde die gereinigte cDNA in 30 µl EB-Puffer eluiert und anschließend auf ein Volumen von 9,5 µl eingedampft.

2.3.2.3 In-Vitro-Transkription

Unter Verwendung des von dem Oligo-dT-Primer angefügten T7-Promotors wurde anschließend die cDNA in cRNA in-vitro-transkribiert. Durch Verwendung von biotin-markiertem UTP war die entstehende cRNA biotin-markiert und konnte nach der Hybridisierung mit Cy5-Streptavidin detektiert werden.

Ansatz In-Vitro-Transkription :

- 9,5 µl gereinigte cDNA
- 4 µl 10 x T7 Reaktionspuffer
- 4 µl T7 ATP-Lösung
- 4 µl T7 GTP-Lösung
- 4 µl T7 CTP-Lösung
- 3 µl T7 UTP-Lösung
- 7,5 µl 10 mM biotin-11-UTP
- 4 µl 10 x T7 Enzym-Mix

Die In-Vitro-Transkription erfolgte 14 h bei 37 °C. Die cRNA wurde anschließend mithilfe des *RNeasy-Kits* (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Zunächst wurden 100 µl RNase-freies Wasser zu dem In-Vitro-Translationsansatz gegeben und die darin enthaltene T7-Polymerase durch Zugabe von 350 µl RLT-Puffer inaktiviert. Anschließend wurde die cRNA durch Zugabe von 250 µl 100 % Ethanol gefällt. Die cRNA wurde dann auf die *RNeasy*-Säule gegeben und zweimal mit je 500 µl RPE-Puffer gewaschen. Nach Trocknen der Säule wurde die biotin-markierte cRNA in 50 µl RNase-freies Wasser eluiert.

Im Anschluss wurde die cRNA-Konzentration durch photometrische Bestimmung der OD₂₆₀ einer 1:50 Verdünnung des Eluats in TE-Puffer bestimmt. Durch Berechnung der Ratio

OD₂₆₀ / OD₂₈₀ wurde die Reinheit der cRNA ermittelt, da nur cRNA mit einer Ratio von über 1,8 für die Hybridisierung verwendet werden kann.

2.3.2.4 Fragmentierung der cRNA und Hybridisierung

Da die Länge der cRNA einen Einfluss auf die Bindungseffizienz an die auf den Microarray gespotteten Oligonukleotide hat, wurde diese zunächst fragmentiert. Hierfür wurden 10 µg cRNA auf ein Endvolumen von 20 µl mit Nuklease-freiem Wasser eingestellt. Dann wurden 5 µl 5 x Fragmentierungspuffer zugegeben und die Lösung für 20 min bei 94 °C inkubiert. Anschließend wurde die cRNA-Lösung für mindestens 5 min auf 4 °C heruntergekühlt.

Ansatz Hybridisierung:

25 µl fragmentierte cRNA
78 µl Hybridisierungspuffer - Komponente A
130 µl Hybridisierungspuffer - Komponente B
27 µl Nuklease-freies Wasser

Zum Auflösen von Sekundärstrukturen wurde der Ansatz für 5 min bei 90 °C denaturiert. Die somit fertiggestellte Hybridisierungslösung wurde sofort für mindestens 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 250 µl der fertigen Hybridisierungslösung auf den Array gegeben. Die Hybridisierung fand 18 h bei 37 °C und 300 rpm statt.

2.3.2.5 Detektion der Signale

Die Arrays wurden zunächst 1 h in ü. N. auf 46 °C vorgewärmtem 0,75 x TNT-Puffer gewaschen. Die Detektion der biotin-markierten cRNA erfolgte mithilfe von an Streptavidin-gekoppeltem Cy5, welches ein Absorptionsmaximum bei 633 nm hat. Das Cy5-Streptavidin bindet an das Biotin der markierten cRNA und ermöglicht somit eine Detektion der Signale mithilfe eines Lasers. Die Arrays wurden 30 min bei RT in Cy5-Streptavidin *Working Solution* im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Arrays viermal für jeweils 5 min bei RT mit 1 x TNT Puffer gewaschen. Zur Entfernung restlicher Puffersalze wurden die Arrays 30 sec in 0,1 x SSC / 0.05 % Tween 20 inkubiert und leicht auf und ab bewegt. Die Arrays wurden anschließend durch Zentrifugation für 3 min bei 644 g getrocknet und dunkel gelagert.

Die Detektion der Signale erfolgte mithilfe des *ScanArray Lite*-Scanners (Perkin Elmer) bei einer Wellenlänge von 649 nm mit einer Auflösung von 5 µm. Mithilfe der *CodeLink Expression Analysis* Software (GE Healthcare) wurde nun die Intensität des emittierten Lichts für jeden Spot des Arrays ermittelt und die Daten median-normalisiert.

1 x TNT Puffer: 0,10 M Tris HCl, pH 7,6
 0,15 M NaCl
 0,05 % (w / v) Tween 20

TNB-Puffer: 0,1 M Tris HCl, pH 7,6
 0,15 M NaCl
 0,5 % (w / v) NEN *blocking reagent* (Perkin Elmer)

0,1 x SSC/0,05 % Tween20: 0,1 x SSC
 0,05 % (w / v) Tween 20

Cy5–Streptavidin–*Working Solution*: 0,002 µg / µl Cy5-Streptavidin in TNB-Puffer

2.4 Seroreaktivität mittels Proteinmakroarray-Screening

Zur Identifizierung weiterer Gliom- und Meningeom-assoziiierter Antigene wurde eine Expressionsbank aus fetalem Gehirn (hex1-Bank, Büssow et al., 1998) mit weiteren Patientenseren gescreent. Diese Expressionsbank liegt als Proteinmakroarray am Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD) vor und besteht aus ca. 38.000 Klonen, von denen ca. 13.000 *in-frame* Proteinsequenzen tragen. Dieser Proteinmakroarray wurde am RZPD wie folgt hergestellt.

Die Antigen-kodierenden Sequenzen liegen, einkloniert im pQE30NST-Vektor, in *E. coli* SCS1 Zellen vor. Diese Bakterienklone wurden zunächst mithilfe eines Roboters auf eine PVDF-Membran, welche auf LB-Agar aufliegt, gespottet und ü. N. bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Expression der einklonierten Antigensequenz durch Zugabe von IPTG induziert und die Membran weitere 3 h bei 37 °C inkubiert. Die Bakterienkolonien auf der Membran wurden nun lysiert und die Membran getrocknet. Anschließend konnte die Membran für ein Primärscreening mit Seren verwendet werden.

Das Screening von jeweils 5 Seren als Serumpool wurde am RZPD durchgeführt. Insgesamt wurden je 6 Pools von Meningeom- bzw. Gliomseren zum Primärscreening verwendet. Die in diesem Primärscreening identifizierten Klone wurden zusammen mit anderen positiven Klonen weiterer Screenings von verschiedenen Krebserkrankungen bzw. Autoimmunerkrankungen zu einem Subarray zusammengestellt. Dieser besteht aus insgesamt 1827 Klonen der ursprünglichen 38.000 Klone und wurde am RZPD wie oben erläutert hergestellt. Das Screening der Subarrays, im Folgenden Proteinmakroarray genannt, mit Einzelseren von Patienten mit Meningeomen, Gliomen und gesunden Kontrollpersonen wurde am Institut für Humangenetik durchgeführt. Insgesamt wurde der Proteinmakroarray mit 57 Seren von Gliompatienten und 53 Seren von Meningeompatienten gescreent. Als Kontrollgruppe für Meningeome und Gliome wurden 60 Seren von gesunden Probanden analysiert. Eine Übersicht über die analysierten Patientenseren sowie ausgewählte klinische Daten sind in Tabelle 3 aufgeführt, eine ausführliche Liste zu den untersuchten Patienten befindet sich in Tabelle C im Anhang.

Tab. 3: Übersicht über die verwendeten Seren zur Differenzierung von Meningeomen und Gliomen mithilfe des Proteinmakroarrays

		Anzahl Seren	Durchschnittsalter (Jahren)	Verhältnis w:m
Meningeome		53	52,2	1,9:1
	WHO I	38	47,1	1,7:1
	WHO II	8	63,1	7:1
	WHO III	7	67,7	1,3:1
Gliome		57	44,3	1:1,9
	WHO I	7	26,0	1:2
	WHO II	13	35,6	1,4:1
	WHO III	9	45,0	1:2
	WHO IV	28	52,7	1:3
Gesunde Kontrollen		60	38,2	1:2,6

w = weiblich, m = männlich

Für das Screening dieser Antigenfilter wurde das Protokoll des Herstellers leicht abgewandelt. Zunächst wurde die Membran in 96 % Ethanol geschwenkt, um alle Proteinbindungsstellen auf der Membran zu aktivieren. Anschließend wurde die Membran zweimal mit H_2O_{dd} gespült und in 1 x TBSTT eingelegt. Nach Entfernen der lysierten Bakterienkolonien durch Abreiben der Membran mit einem staubfreien Tuch wurde die Membran 2 x 10 min in 1 x TBSTT gewaschen. Durch Abspülen der Membran mit 1 x TBS wurden Reste von Tween20 und Triton x-100 entfernt und die Membran anschließend 2 x 10 min in 1 x TBS gewaschen. Zum Abblocken freier Proteinbindungsstellen auf der Membran wurde diese nun für 2 h in *Blocking-Lösung* inkubiert. Anschließend wurde das zu untersuchende Patientens Serum in

einer 1:1000 Verdünnung in *Blocking*-Lösung auf die Membran gegeben und ü. N. bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. In dieser Zeit konnten sich im Serum befindliche Autoantikörper an die entsprechenden Antigene auf der Membran anlagern. Das Serum wurde am folgenden Tag entfernt und bei 4 °C aufbewahrt. Nach 3 x 10 min Waschen in 1 x TBST wurden alle an die Membran angelagerten Antikörper durch 30 min Inkubation in auf 70 °C erwärmter *Stripping*-Lösung wieder entfernt. Diese erste Hybridisierung dient somit, wie die Präabsorption der Seren des Spotassays, dem Entfernen der im Serum vorhandenen Antikörper gegen bakterielle Proteine. Dadurch wird eine höhere Spezifität der Signale erreicht. Anschließend wurde die Membran 2 x 20 min in 1 x TBST gewaschen und mit 1 x TBS gespült. Nach 2 x 10 min Waschen in 1 x TBS folgte die Inkubation für 2 h in *Blocking*-Lösung. Die aufbewahrte Serumverdünnung wurde dann ein zweites Mal auf die Membran gegeben und ü. N. bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Serum verworfen, die Membran 3 x 10 min in 1 x TBS gewaschen und dann 2 h in Sekundär-Antikörper-Lösung (Anti-human IgG, IgM, IgA (H+L)-Cy5 (Dianova), 1:1000 in *Blocking*-Lösung) inkubiert. Der sekundäre Antikörper bindet spezifisch an die konstante Region des humanen Immunglobulins, welche sich aufgrund der Antigen-Antikörper-Bindung auf der Membran befinden. Anschließend wurde die Membran 4 x 10 min in 1 x TBST und 2 x 10 min in 1 x TBS gewaschen und zwischen zwei *Whatman*-Papieren ü. N. getrocknet. Die Signale wurden mithilfe eines *Typhoon*-Scanners (GE Healthcare) bei 570 nm detektiert.

1 x TBS:	0,15 M NaCl 0,01 M Tris-Cl, pH 7,5
1 x TBST:	0,5 M NaCl 0,02 M Tris-Cl, pH 7,5 0,05 % (w / v) Tween 20
1 x TBSTT:	0,5 M NaCl 0,02 M Tris-Cl, pH 7,5 0,05 % (w / v) Tween20 0,5 % (w / v) Triton-X100
<i>Stripping</i> -Lösung:	0,0655 M Tris-Cl, pH 6,8 2 % (w / v) SDS
<i>Blocking</i> -Lösung:	1 x TBST 3 % (w / v) Milchpulver

2.5 Statistische Auswertung

Die im Folgenden beschriebenen statistischen Auswertungen der Experimente wurden am Zentrum für Bioinformatik in Saarbrücken von Andreas Keller im Rahmen seiner Dissertation durchgeführt. Für detaillierte Informationen zu den einzelnen Berechnungen sei auf die Dissertation von Herrn Keller bzw. auf die entsprechende Literatur verwiesen. Die Berechnungen werden im Anschluss nur vom Prinzip her erläutert.

2.5.1 Statistische Grundbegriffe

2.5.1.1 Parameter einer Klassifikation

Um die Qualität einer Klassifikationsmethode zu bestimmen, werden verschiedene Parameter berechnet. In dieser Arbeit wurden als Parameter Sensitivität, Spezifität, Korrektklassifizierungsrate, im weiteren Verlauf als Genauigkeit bezeichnet, und AUC-Wert berechnet. Im Folgenden werden diese Parameter am Beispiel der Klassifikation von Meningeomseren und gesunden Kontrollseren näher erläutert.

Die Sensitivität stellt die sogenannte Richtigpositiv-Rate dar und gibt somit an, wie empfindlich der angewandte Test ist. Somit bedeutet eine Sensitivität von 99 %, dass 99 % der als Meningeomseren klassifizierten Seren tatsächlich Meningeomseren sind. Die Sensitivität berechnet sich hier mathematisch als Quotient der Anzahl der als Meningeomseren klassifizierten Meningeomseren durch die Anzahl der insgesamt getesteten Meningeomseren.

Die Spezifität hingegen gibt die sogenannte Richtignegativ-Rate an. In unserem Zusammenhang bedeutet eine Spezifität von 99 % daher, dass 99 % der durch den Test als Kontrollseren klassifizierten Seren tatsächlich Kontrollseren sind. Die Spezifität errechnet sich als Quotient der Anzahl der als Kontrollseren klassifizierten Kontrollseren durch die Anzahl der insgesamt getesteten Kontrollseren. An dieser Stelle sei darauf verwiesen, dass bei der Klassifikation von z. B. Meningeomen versus Gliomen als Kontrollen, die Spezifität die Prozentzahl der richtig als Gliomseren klassifizierten Seren wiedergibt, wobei man im allgemeinen Gebrauch dann nicht von richtig-negativ spricht.

Die Korrektklassifizierungsrate oder Genauigkeit berechnet sich als Quotient aller richtig klassifizierten Seren gegenüber allen getesteten Seren. Sie liefert damit einen generellen Wert für die Qualität der Klassifikation.

Die Werte für Spezifität und Sensitivität sind abhängig von dem Schwellenwert, der als Basis für eine Klassifikation gewählt wird. Alle Seren oberhalb eines bestimmten Schwellenwerts werden zu der einen Klasse gezählt, alle Seren unterhalb des Schwellenwerts zu der anderen. Um den optimalen Schwellenwert für solch eine Klassifikation zu finden, wird die sogenannte „Receiver-Operator-Characteristics“-Kurve (ROC) verwendet. Sie gibt die Spezifität (y-Achse) als Funktion von 1 minus Sensitivität (x-Achse) bei Durchlaufen aller möglichen Schwellenwerte für eine Klassifikation wieder. Die Fläche unter der Kurve stellt den sogenannten AUC-Wert („Area under the ROC-curve“) dar, welcher bei einer optimalen Klassifikation bei 1 liegt.

2.5.1.2 Mutual Information

Die sogenannte *Mutual Information* ist ein Begriff aus der Informationstheorie und dient als Maß der gegenseitigen Abhängigkeit von zwei Variablen. In dieser Arbeit wird die *Mutual Information* als Maß für den diagnostischen Informationsgehalt eines Antigens verwendet. Antigene mit einer hohen *Mutual Information* eignen sich somit gut für die Klassifikationsaufgabe, während Antigene mit niedriger *Mutual Information* sich weniger für diese Klassifikationsaufgabe eignen. Für die genaue Verfahrensweise zur Theorie und Berechnung der *Mutual Information* sei auf die Literatur verwiesen [Shannon, 1984; Keller et al., 2007].

2.5.2 Auswertung der serologischen Spotassays von Meningeomen und Gliomen durch den Naïve Bayes Ansatz

Die Ergebnisse der serologischen Spotassays, sowohl der Meningeome als auch der Gliome, wurden mithilfe des am Zentrum für Bioinformatik in Saarbrücken entwickelten Webtools „SePACS“ ausgewertet [Keller et al., 2007]. Dieses Programm versucht anhand von Seroreaktivitätsmustern zwei Datengruppen, z. B. von Seren von Meningeompatienten und Seren von gesunden Probanden, zu differenzieren. Es werden verschiedene statistische Lernverfahren auf ihre Anwendbarkeit getestet. Im Folgenden wird nur die Auswertung

mithilfe des *Naïve Bayes* Ansatzes näher ausgeführt, da dieser sehr gute und einfach interpretierbare Ergebnisse lieferte.

Bei dem *Naïve Bayes* Ansatz werden zunächst die bedingten Wahrscheinlichkeiten des Auftretens einer positiven bzw. negativen Serumreaktion gegenüber einem Antigen in einem Meningeomserum bzw. in einem Kontrollserum in einem Trainingsset berechnet. Diese Berechnung wurde für alle Antigene durchgeführt, d. h. für jedes Antigen gibt es folgende vier bedingte Wahrscheinlichkeiten: 1) positive Reaktion in einem Meningeomserum; 2) negative bzw. keine Reaktion in einem Meningeomserum; 3) positive Reaktion in einem Kontrollserum; 4) negative bzw. keine Reaktion in einem Kontrollserum. Die bedingte Gesamtwahrscheinlichkeit für das Auftreten eines bestimmten Musters an Antigenreaktionen bei einem Meningeom- bzw. Kontrollserum ergibt sich dann als Produkt der bedingten Wahrscheinlichkeiten des Auftretens der einzelnen, oben erläuterten Serumreaktionen auf die einzelnen Antigene. Anschließend wurde der Quotient der bedingten Wahrscheinlichkeiten für ein unbekanntes Serum aus einem Testset für das Auftreten eines Musters A in einem Tumorseum und in einem Kontrollserum gebildet. War dieser Quotient größer als 1, also die bedingte Auftretenswahrscheinlichkeit dieses Seroreaktivitätsmusters in einem Tumorseum größer als die in einem Normalserum, wurde das getestete Serum als Tumorseum eingestuft. Bei einem Quotienten kleiner als 1 wurde das Serum als Kontrollserum eingestuft.

Des Weiteren wurde eine sogenannte 10-fache Kreuzvalidierung durchgeführt. Hierbei wurden die getesteten Seren zufällig in zehn gleich große Gruppen eingeteilt. Mit neun der zehn Gruppen wurde das sogenannte Trainingsset gebildet und anhand dieses Trainingssets wurden wie oben erläutert die bedingten Wahrscheinlichkeiten errechnet. Mit der zehnten Gruppe, dem Testset, wurde das System anschließend getestet und somit Sensitivität, Spezifität und Genauigkeit der Trennung errechnet. Diese Berechnung wurde einmal für jede der zehn Gruppen als Testset durchgeführt und als Ergebnis jeweils Spezifität, Sensitivität und Genauigkeit errechnet und gemittelt. Die zufällige Einteilung der Seren in Trainings- und Testset wurde 100-mal durchgeführt (Permutation) und die Ergebnisse der jeweiligen 10-fachen Kreuzvalidierung für Spezifität, Sensitivität und Genauigkeit auf ihre Korrelation hin untersucht. Somit sollte ausgeschlossen werden, dass die Qualität der erreichten Differenzierung von Meningeom- und Kontrollseren auf der Einteilung der Seren in Trainings- und Testset beruht.

2.5.3 Auswertung der Microarrays von Meningeomen

Insgesamt wurde die Genexpression in 24 Meningeomen mithilfe des *Human Whole Genome* Arrays (GE Healthcare), welcher 55.000 ESTs, darunter ca. 38.000 bekannte Gene, enthält, bestimmt. Die erhaltenen Expressionswerte wurden Hintergrund-korrigiert und nicht korrekt gemessene Werte wurden von weiteren Betrachtungen ausgeschlossen. Jeder Microarray wurde anschließend median-normalisiert, und es wurde der Logarithmus der Expressionswerte errechnet.

Die statistische Auswertung der Daten wurde mithilfe des Webtools „*GeneTrailExpress*“ durchgeführt, welches am Zentrum für Bioinformatik in Saarbrücken zur Auswertung von Microarray-Daten entwickelt wurde [Backes et al., 2007; Keller et al., 2008b]. Es wurden insgesamt drei Analysen durchgeführt: Verglichen wurde zum einen die Genexpression in den 24 Meningeomen mit der Genexpression der zwei Dura-Kontrollen, des Weiteren die Genexpression in Meningeomen des WHO-Grades I gegenüber der Genexpression der WHO-Grade II und III sowie die Genexpression in Meningeomen mit meningoethelialer und syncytialer Morphologie gegenüber der Genexpression in Meningeomen mit überwiegend fibroblastischer Morphologie. Die von „*GeneTrailExpress*“ durchgeführten Berechnungen werden im Folgenden am Beispiel der Untersuchung der Genexpression in WHO I Meningeomen im Vergleich zu WHO II / III Meningeomen näher erläutert.

Nach Einlesen der median-normalisierten Expressionswerte aller Transkripte wurde der Median der Expressionswerte für jedes Transkript in WHO I Meningeomen bzw. in WHO II / III Meningeomen berechnet. Anschließend wurde für jedes Transkript der Quotient der beiden Mediane gebildet, d. h. der Median von WHO I durch den Median von WHO II / III, und die Transkripte wurden anhand dieses Quotienten sortiert. Demzufolge stehen Transkripte, welche in WHO I Meningeomen stärker exprimiert sind als in WHO II / III Meningeomen, am Anfang der Liste, während Transkripte, welche in WHO II / III Meningeomen stärker exprimiert werden als in WHO I Meningeomen, am Ende der Liste stehen. Eine solche sortierte Liste wurde auch analog für die Vergleiche der Genexpression in Meningeomen zu Dura und meningoethelialen / syncytialen Meningeomen zu fibroblastischen Meningeomen generiert.

Das Analysewerkzeug „*GeneTrailExpress*“ analysierte diese Listen anschließend mithilfe der sogenannten „*Gene Set Enrichment Analyse*“ (GSEA). Bei dieser Auswertemethode wird mit Absicht auf die Festlegung eines Schwellenwertes für eine Über- bzw. Unterexpression verzichtet, da genau die Wahl dieses Schwellenwerts kritisch ist. Wählt man diesen zu hoch, können z. B. schwach überexprimierte Gene nicht erkannt werden, wählt man diesen allerdings zu niedrig, werden viele Gene erkannt, welche nur durch individuelle Schwankungen überexprimiert scheinen. Das „*Gene Set Enrichment*“-Verfahren hingegen analysiert das Expressionsmuster aller Gene mithilfe der oben erwähnten sortierten Listen. Zunächst wurde eine Zuordnung aller Gene anhand ihrer Gene ID in die einzelnen Kategorien der Datenbanken „*Gene Ontology*“ (GO), „*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*“ (KEGG), TransPATH, TransFAC, und für die chromosomale Lokalisation der Gene vorgenommen.

Das Prinzip der GSEA beruht nun darauf, dass Gene, welche zu einer differenziell exprimierten Kategorie gehören, sich in der sortierten Liste am oberen oder unteren Ende anhäufen, während Gene einer nicht expressionsveränderten Kategorie sich zufällig in der sortierten Liste verteilen. Um die sortierte Liste nun auf eine solche Anhäufung in einer bestimmten Kategorie K, z. B. KEGG-Pfad „*cell cycle*“, welchem m Gene aus der Gesamtzahl an n Genen zugeordnet wurden, hin zu untersuchen, wurde die sogenannte „*Running Sum*“ gebildet: Beginnend mit dem obersten Gen in der sortierten Liste wurde nun eine laufende Summe errechnet: Gehörte das Gen zu der untersuchten Kategorie, wurde die Differenz $n-m$ zu der laufenden Summe addiert. Gehörte das Gen nicht zu der untersuchten Kategorie, wurde m von der laufenden Summe subtrahiert. Die maximale Abweichung der laufenden Summe von Null wurde als Maß der Signifikanz gesehen, mit der eine Kategorie differenziell exprimiert wird.

Die laufende Summe wurde anschließend grafisch aufgetragen, mit dem Index der Transkripte in der Liste auf der x-Achse und der laufenden Summe auf der y-Achse. Zeigt sich nun eine Kurve in U-Form, so akkumulieren die Gene der betrachteten Kategorie weiter unten in der sortierten Liste (siehe Abb. 2 A), während im umgekehrten Fall die Kurve eher eine Pyramidenform annimmt (siehe Abb. 2 B). Im Beispiel der Untersuchung der Genexpression in WHO I Meningeomen im Vergleich zu den WHO II / III Meningeomen, stellt Abbildung 2 A eine Kategorie dar, welche in WHO II / III Meningeomen stärker exprimiert wird als in WHO I Meningeomen, während Abbildung 2 B eine Kategorie

darstellt, welche in WHO II / III Meningeomen schwächer exprimiert wird als in WHO I Meningeomen. Als signifikant differenziell exprimierte Kategorien werden alle Kategorien betrachtet, welche einen p-Wert von kleiner als 0,05 aufweisen.

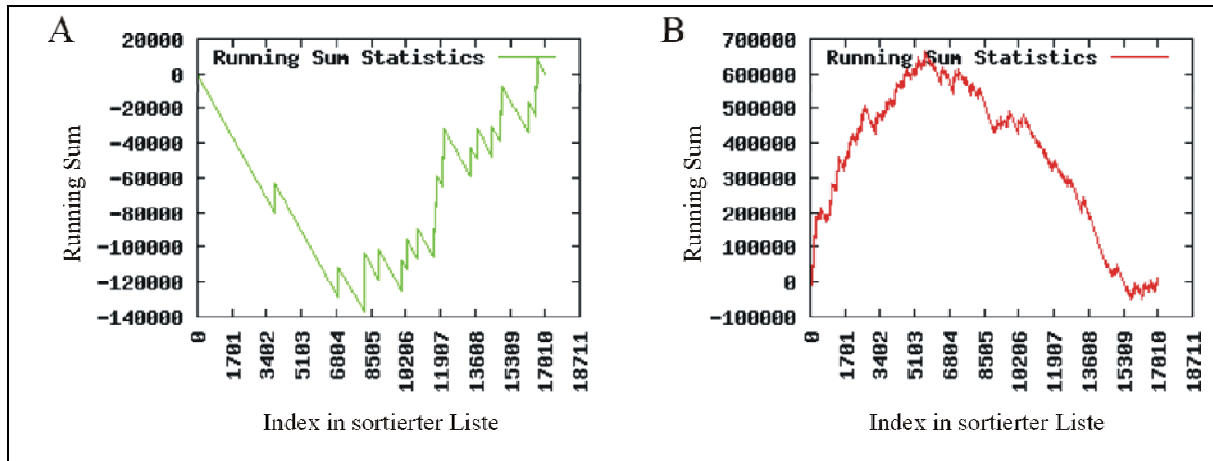


Abb. 2: Beispiele für die Auswertung der Microarrays mittels *Running Sum*. A: Die betrachtete Kategorie enthält viele unterexprimierte Gene, d. h. die Gene dieser Kategorie akkumulieren am Ende der sortierten Liste, wodurch der Graph eine U-Form erhält. B: Die betrachtete Kategorie enthält viele überexprimierte Gene, d. h. die Gene dieser Kategorie akkumulieren am Anfang der sortierten Liste, wodurch der Graph eine Pyramiden-Form erhält.

2.5.4 Untersuchung zur Überexpression Meningeom-assoziiierter Antigene

Die Überexpression von Tumorantigenen wird als ein Grund für die Immunogenität dieser Antigene angesehen. Ob Überexpression auch bei den Meningeom-assoziierten Antigenen, welche von Comtesse et al. identifiziert wurden, eine Rolle bei der Immunogenität spielt, wurde in meiner Dissertation ebenfalls analysiert. Hierfür wurden von 24 Meningeompatienten jeweils die Genexpression der Tumore und die Seroreaktivitätsprofile gegenüber den oben erwähnten Antigenen autolog untersucht. Es wurden zwei Analysen durchgeführt: Zum einen wurde die Expression der Antigen-codierenden Gene mit der Seroreaktivität in Bezug gesetzt und zum anderen wurde die Gesamtexpression der Meningeome von Patienten, welche eine positive Seroreaktivität gegenüber einem bestimmten Antigen aufwiesen, mit der von Patienten verglichen, welche keine Seroreaktivität gegenüber diesem Antigen zeigten.

2.5.4.1 Überexpression von Meningeom-assoziierten Antigenen

Zunächst wurden 22 der 57 Antigene von der Betrachtung ausgeschlossen, da diese in weniger als fünf der 24 betrachteten Meningeompatienten eine Autoantikörperantwort

auslösten. Die Expression der verbleibenden 35 Meningeom-assoziierten Antigene wurde nun mit dem Seroreaktivitätsmuster verglichen. Es wurde folgende Berechnung für jedes dieser 35 Antigene durchgeführt: Für jedes Antigen i wurde der Median der Expressionswerte der Antigen-codierenden Gene bei allen Patienten, deren Seren eine Reaktivität gegenüber Antigen i zeigten, sowie der Median der Expressionswerte bei allen Patienten, deren Seren keine Reaktivität gegenüber Antigen i aufwiesen, berechnet. Anschließend wurde der Quotient beider Mediane errechnet. Als Maß für eine eventuell vorhandene Überexpression wurde der Mittelwert der Expressionsquotienten aller 35 Antigene verwendet. Diese Berechnungen wurden sowohl für alle Meningeome durchgeführt, als auch für jeden WHO-Grad einzeln.

In einer zweiten Analyse wurde die Expression aller Antigene in Meningeomen zur Seroreaktivität in Bezug gesetzt. Hierfür wurden die Expressionswerte aller Antigene in zwei Gruppen R und N eingeteilt: Für jedes Antigen a und jeden Microarray m wurde der Expressionswert $m(a)$ des Antigen a codierenden Gens der Gruppe R hinzugefügt, wenn Antikörper gegen das Antigen a im Serum des autologen Patienten detektiert wurden. Lag keine Seroreaktivität gegenüber Antigen a im autologen Patienten vor, so wurde $m(a)$ der Gruppe N zugeteilt. Somit enthielt die Gruppe R alle Expressionswerte der Antigene in seropositiven Patienten und die Gruppe N alle Expressionswerte der Antigene in seronegativen Patienten.

2.5.4.2 Veränderung der Gesamtexpression in Meningeomen in Abhängigkeit von der Seroreaktivität

Hierfür wurden folgende Berechnungen für jedes der 35 Antigene durchgeführt: Die 24 Microarrays wurden in zwei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe enthielt alle Microarrays der Patienten, deren Seren eine Reaktivität gegenüber dem betrachteten Antigen zeigten, während die zweite Gruppe alle Microarrays der Patienten enthielt, deren Seren keine Reaktivität gegenüber diesem Antigen zeigten. Für jedes Transkript wurde anschließend der Median der Expressionswerte für beide Gruppen errechnet, der Quotient dieser Mediane gebildet und die Transkripte anhand dieses Quotienten absteigend in eine Liste sortiert. Ein Quotient größer 1 gab somit eine erhöhte Expression des Transkripts an, wenn eine Seroreaktivität gegenüber dem untersuchten Antigen vorlag. Für jedes der 35 Antigene wurde so untersucht, ob bei Patienten mit positiver Seroreaktivität eine signifikant erhöhte Anzahl an

über- oder unterexprimierten Genen vorlag. Hierfür wurden auch verschiedene Schwellenwerte für eine Überexpression untersucht.

Zur Überprüfung der Resultate wurde eine zweite Berechnung durchgeführt. Hierfür wurden die Microarrays zufällig in zwei Gruppen eingeteilt und die obige Berechnung durchgeführt. Dies wurde 1000-mal wiederholt und die Anzahl an überexprimierten Genen über einem bestimmten Schwellenwert aus diesen Zufallsexperimenten grafisch in einem Histogramm festgehalten. Die Normalverteilung der Ergebnisse dieser Kontrollexperimente wurde durch einen statistischen Test gezeigt. Lag nun die Anzahl an überexprimierten Genen bei positiver Seroreaktivität gegenüber einem bestimmten Antigen über der Anzahl an überexprimierten Genen aus den Zufallsexperimenten, so wurde eine generelle Hochregulierung der Genexpression in diesen Meningeomen angenommen.

2.5.5 Auswertung des Proteinmakroarrays in Meningeomen und Gliomen

Die Auswertung der Signale erfolgte mithilfe einer automatischen, computergestützten Bildauswertungs-Software, welche am Zentrum für Bioinformatik in Saarbrücken entwickelt wurde. Prinzipiell wird der Proteinmakroarray zunächst in sogenannte Target-Areale aufgeteilt, wobei ein Target-Areal genau einem Spot entspricht. Die im Target-Areal enthaltenen Pixel werden anschließend in Vordergrund- und Hintergrundpixel durch Anwenden durch sogenanntes *k-means Clustering* eingeteilt. Durch den *Black-Hat-Operator* werden dann die dunklen Vordergrundpixel von den blassen Hintergrundpixeln getrennt, der Mittelwert aller Vordergrundpixel errechnet und dem Proteinspot als Intensität zugewiesen. Da jeder Klon in Duplikaten auf dem Array gespottet ist, wird anschließend die Intensität der beiden Spots gemittelt. Somit hat jeder der 1827 Klone auf einem Array nun einen Intensitätswert zwischen 0 und 256. Target-Areale, in denen kein Spot detektierbar war, wurden automatisch mit „*not available*“ gekennzeichnet. Alle Klone, die in mehr als zehn aller getesteten Seren mit „*not available*“ gekennzeichnet waren, wurden von allen weiteren Berechnungen ausgeschlossen.

Um Unterschiede in der Gesamtintensität der einzelnen Arrays untereinander zu minimieren, wurde anschließend eine sogenannte Quantil-Normalisierung durchgeführt. Für die Berechnungen zur Trennung von Tumorpatientenseren und Kontrollseren werden nun die Intensitätswerte verwendet, da die Wahl eines Schwellenwertes, oberhalb dessen ein Klon als

positiv zu werten ist, einen Informationsverlust und somit möglicherweise einen Verlust an Differenzierungsqualität für die durchzuführende Trennung bedeuten kann.

Für die einzelnen Klassifikationsberechnungen wurde eine lineare Support-Vektor-Maschine verwendet. Der Mittelwert für Spezifität, Sensitivität und Genauigkeit wurde aus 100 Wiederholungen der 10-fach-kreuzvalidierten Klassifikation errechnet. Um zu kontrollieren, ob diese Werte nicht in der Einteilung der Seren in der 10-fachen Kreuzvalidierung, bzw. in der z. T. unterschiedlichen Anzahl an getesteten Seren in den einzelnen, zu klassifizierenden Gruppen begründet liegen, wurde eine stratifizierte, zufällige Permutation der Zuordnung in Tumor- und Kontrollserum vorgenommen und anhand dieser Einteilung die Berechnung von Spezifität, Sensitivität und Genauigkeit wie oben wiederholt. Als Maß für die Stabilität einer Klassifikation wurden für die Mittelwerte von Spezifität, Sensitivität und Genauigkeit jeweils die 95 % Konfidenz-Intervalle angegeben.

Zur Beurteilung des Informationsgehalts eines einzelnen Klons für eine Klassifikationsaufgabe, wird an dieser Stelle der AUC-Wert herangezogen. Dieser wird hier wie folgt berechnet: Für alle möglichen Schwellenwerte t der Spotintensität werden alle Tumorseren, deren Intensität größer als t ist, als richtig-positiv (RP) angesehen, alle Kontrollseren, deren Intensität größer als t ist, als falsch-positiv (FP). Umgekehrt werden alle Tumorseren, deren Intensität kleiner als t ist, als falsch-negativ (FN), und alle Kontrollseren, deren Intensität kleiner als t ist, als richtig-negativ (RN) angesehen. Anschließend wurde so für jeden Schwellenwert t die Spezifität ($RN / RN + FP$) und Sensitivität ($RP / RP + FN$) errechnet, die ROC-Kurve anhand dieser Werte erstellt und so für jeden Klon ein AUC-Wert angegeben. Alle Klone, deren AUC-Wert zwischen 0 und 0,3 bzw. zwischen 0,7 und 1 liegt, werden als wertvoll für die gegebene Klassifikation angesehen.

Um die Häufigkeit des Vorkommens von Autoantikörpern gegen einen bestimmten Klon angeben zu können, wird die Frequenz dieser Autoantikörperantwort berechnet. Hierfür werden alle Seren, in denen die normalisierte Spotintensität des Klons größer als 50 ist, als seropositiv gewertet.

Ergebnisse

3.1 Meningeome

3.1.1 Seroreaktivität in Meningeomen mittels serologischem Spotassay

Die Arbeitsgruppe um Comtesse et al. hat in früheren Studien Meningeom-assoziierte Antigene identifiziert und erste Untersuchungen zur Frequenz der Antikörperreaktivität dieser Antigene an einer geringen Anzahl Meningeompatienten durchgeführt [Heckel et al., 1998; Comtesse et al., 1999; Comtesse et al., 2002, Comtesse et al., 2005]. Insgesamt konnte sie 57 Meningeom-assoziierte Antigene identifizieren und jeweils 24 Seren von Meningeompatienten und gesunden Kontrollen auf Autoantikörper gegenüber den 57 Antigenen untersuchen. Es ist ein Ziel dieser Arbeit, die Häufigkeit der Autoantikörperantwort gegen diese Antigene durch Erhöhung der Anzahl an untersuchten Seren statistisch abzusichern. Des Weiteren sollten die sich aus dem Häufigkeitsprofil ergebenden Seroreaktivitätsmuster der Patienten mit denen einer gesunden Kontrollgruppe verglichen werden. Hierbei sollte vor allem die Möglichkeit untersucht werden, ob diese Seroreaktivitätsmuster das Vorhandensein von Meningeomen indirekt anzeigen können. Hierfür wurden 69 Seren von Meningeompatienten sowie 66 Seren von gesunden Probanden auf Reaktivität gegenüber den in den Studien von Comtesse et al. identifizierten 57 Meningeom-assoziierten Antigenen mit der Methode des serologischen Spotassays untersucht.

Bei dem Spotassay-Verfahren werden die Meningeom-assoziierten Antigene, welche in einem Phagenvektor einkloniert vorliegen, mit Wirtsbakterien inkubiert und auf eine mit Nähragar beschichtete Nitrozellulosemembran aufgebracht. Die Phagen-infizierten Bakterien synthetisieren jeweils das einklonierte Antigen, welches an die proteinbindende Membran bindet. Die Membran wird anschließend mit dem Patientenserum inkubiert. Sind nun Autoantikörper gegen eines der rekombinanten Proteine in dem getesteten Serum vorhanden, binden diese an das entsprechende Protein. Im Anschluss erfolgt die Detektion der gebundenen Autoantikörper durch einen Enzym-markierten sekundären Antikörper, welcher menschliche IgG-Moleküle erkennt.

Die Ergebnisse werden im Folgenden mit den bereits vorhandenen Daten zusammengefasst dargestellt.

3.1.1.1 Seroreaktivität und *Mutual Information*

Zunächst sollte die Häufigkeit der Autoantikörperantwort gegen die 57 Meningeom-assoziierten Antigene in einer großen Anzahl von Meningeomseren und Seren von gesunden Kontrollprobanden zur statistischen Absicherung der vorläufigen Ergebnisse von Comtesse et al. bestimmt werden. Zusammen mit den insgesamt 48 Seren von Comtesse et al. wurden 93 Seren von Meningeompatienten sowie 90 Seren von Kontrollprobanden ohne bekannte Erkrankung auf Autoantikörper gegenüber diesen Antigenen untersucht. Die Seroreaktivität für die 57 Meningeom-assoziierten Antigene, d. h. die Frequenz des Auftretens von Autoantikörpern gegen diese Antigene in den untersuchten Seren, ist in Tabelle 4 aufgeführt. Von den 57 Antigenen konnte bei insgesamt acht Antigenen eine Seroreaktivität ausschließlich mit Seren von Meningeompatienten, nicht aber mit Seren der gesunden Kontrollgruppe festgestellt werden. Diese Antigene werden im Folgenden als Meningeom-spezifisch bezeichnet. Zu diesen Meningeom-spezifischen Antigenen gehören die Gene „*natural killer-tumor recognition sequence*“ (NKTR), „*progesterone immunomodulatory binding factor 1*“ (PIBF1), „*thioredoxin domain containing 16*“ (TXNDC16), „*Y box binding protein 1*“ (YBX1), „*Rho GTPase activating protein 18*“ (ARHGAP18), „*meningioma expressed antigen 11*“ (MGEA11), „*mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4*“ (MAP4K4) und „*platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform 1b, alpha*“ (PAFAH1B1). Die höchste Seroreaktivität mit Meningeomseren unter den Meningeom-spezifischen Antigenen zeigte NKTR mit 36,6 %. Die höchste Seroreaktivität mit Meningeomseren unter allen Antigenen wurde für das Gen „*TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase 2*“ (TNKS2) festgestellt, gegen welches in insgesamt 60,2 % der Seren von Meningeompatienten, allerdings auch in 45,6 % der Seren der gesunden Kontrollgruppe, Autoantikörper nachgewiesen werden konnten.

Die Gesamtheit der Seroreaktivität eines Serums gegenüber allen 57 Meningeom-assoziierten Antigenen wird als Seroreaktivitätsmuster oder -profil bezeichnet. Für die Differenzierung der Meningeome von gesunden Kontrollen basierend auf solchen Seroreaktivitätsmustern wurden nicht nur die Meningeom-spezifischen Antigene verwendet, sondern alle 57 Meningeom-assoziierten Antigene betrachtet. Als Maß für den diagnostischen Informationsgehalt der Antigene wurde die *Mutual Information* verwendet (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.5.1.2). Die *Mutual Information* für jedes Antigen gibt hierbei an, wie gut sich die Seren der Meningeompatienten von Seren der gesunden Kontrollen mithilfe dieses Antigens

unterscheiden lassen. Die Antigene in Tabelle 4 sind anhand dieses Informationsgehaltes sortiert. Die Einführung eines solchen Wertes macht Sinn, da ein Antigen, welches z. B. mit 60 % der Meningeomseren, aber auch mit 15 % der Kontrollseren reagiert, mehr Information zu der Trennung von Meningeomen und Kontrollen beiträgt, als ein Meningeom-spezifisches Antigen, welches nur mit 10 % der Meningeomseren reagiert.

Das Antigen mit dem höchsten Informationsgehalt für die Differenzierung der Meningeomseren von den Seren der gesunden Kontrollen ist das Meningeom-spezifische Antigen NKTR, welches mit 36,6 % der Seren von Meningeompatienten reaktiv war. Die zweithöchste *Mutual Information* wurde bereits für ein nicht Meningeom-spezifisches Antigen, nämlich für das Antigen „*nitrilase family member 2*“ (NIT2) festgestellt, gegen welches in insgesamt 36,6 % der Seren von Meningeompatienten, allerdings auch in 3,3 % der Seren der gesunden Kontrollgruppe, Autoantikörper nachgewiesen werden konnten. In Abbildung 3 ist die *Mutual Information* für alle Antigene grafisch aufgetragen. Es wird auch hier deutlich, dass viele nicht Meningeom-spezifische Antigene einen größeren diagnostischen Informationsgehalt für die Trennung von Meningeompatienten und Gesunden als die meisten Meningeom-spezifischen Antigene zeigen. Weitere Informationen zu zellulärer Lokalisation und Funktion der Antigene sind in Tabelle A im Anhang aufgelistet.

Tab. 4: Seroreaktivität von Meningeompatienten und Gesunden gegenüber Meningeom-assoziierten Antigenen

Antigen	Meningeome (n=93) [%]				Gesund (n=90) [%]	Mutual Information**
	alle (n=93)	WHO I (n=40)	WHO II (n=27)	WHO III (n=26)		
NKTR*	36,6	47,5	29,6	26,9	0	0,21
NIT2	36,6	40	51,9	15,4	3,3	0,14
PIBF1*	21,5	22,5	25,9	15,4	0	0,12
TXNDC16*	21,5	20	29,6	15,4	0	0,12
SOX2	23,7	27,5	22,2	19,2	1,1	0,10
TBC1D4	29	37,5	22,2	23,1	4,4	0,09
YBX1*	15,1	17,5	14,8	11,5	0	0,08
C6orf153	15,1	15	22,2	7,7	1,1	0,06
CDH12	32,3	42,5	29,6	19,2	8,9	0,06
TMEM57	30,1	40	14,8	30,8	7,8	0,06
SLC6A3	14	12,5	18,5	11,5	2,2	0,04
SART1	38,7	47,5	44,4	19,2	17,8	0,04
USP37	12,9	2,5	29,6	11,5	1,1	0,04
ANK2	17,2	17,5	18,5	15,4	4,4	0,03
DLD	15,1	12,5	18,5	15,4	3,3	0,03
JAKMIP2	39,8	27,5	37	61,5	21,1	0,03
MLLT4	4,3	2,5	0	11,5	16,7	0,03
SC65	21,5	15	25,9	26,9	6,7	0,03
SFRS11	26,9	20	37	26,9	12,2	0,03
TBC1D2	41,9	42,5	37	46,2	22,2	0,03
TNKS	12,9	15	14,8	7,7	2,2	0,03
ARHGAP18*	3,2	7,5	0	0	0	0,02
HNRPA1	40,9	37,5	48,1	38,5	25,6	0,02
KIAA0999	15,1	10	22,2	15,4	5,6	0,02
MGEA11*	4,3	10	0	0	0	0,02
MGEA5	15,1	15	7,4	23,1	4,4	0,02
MGEA5s	12,9	15	14,8	7,7	3,3	0,02
MGEA6	16,1	15	14,8	19,2	6,7	0,02
MOCS1	21,5	20	22,2	23,1	10	0,02
NIN	20,4	20	22,2	19,2	7,8	0,02
PARP1	33,3	32,5	40,7	26,9	18,9	0,02
IQWD1	32,3	22,5	33,3	46,2	16,7	0,02
RTN4	16,1	22,5	18,5	3,8	30	0,02
SWAP70	23,7	17,5	22,2	34,6	12,2	0,02
TNKS2	60,2	67,5	55,6	53,8	45,6	0,02
IFT74	11,8	20	3,7	7,7	5,6	0,01
IGFBP5	12,9	17,5	11,1	7,7	7,8	0,01
MAP4K4*	1,1	0	0	3,8	0	0,01
PAFAH1B1*	1,1	2,5	0	0	0	0,01
RBPJ	22,6	22,5	29,6	15,4	33,3	0,01
SASH1	21,5	20	14,8	30,8	13,3	0,01
SMARCA4	2,2	0	3,7	3,8	6,7	0,01
HSP90B1	18,3	7,5	29,6	23,1	11,1	0,01
APLP1	5,4	2,5	7,4	7,7	6,7	0,00
BRAP	53,8	55	51,9	53,8	47,8	0,00
FAM184A	26,9	20	33,3	30,8	30	0,00
WDR85	21,5	25	29,6	7,7	18,9	0,00
CTGF	10,8	5	11,1	19,2	6,7	0,00
BPTF	2,2	2,5	0	3,8	1,1	0,00
HSPCB	11,8	17,5	7,4	7,7	10	0,00
INA	19,4	15	33,3	11,5	15,6	0,00
MGEA14	9,7	17,5	3,7	3,8	6,7	0,00
NCOA7	12,9	22,5	7,4	3,8	16,7	0,00
PRC1	28	27,5	25,9	30,8	25,6	0,00
SNRK	26,9	22,5	29,6	30,8	28,9	0,00
TPM3	10,8	12,5	3,7	15,4	7,8	0,00
ZBTB5	9,7	10	11,1	7,7	7,8	0,00

* Meningeom-spezifische Antigene

** Mutual Information = diagnostischer Informationsgehalt

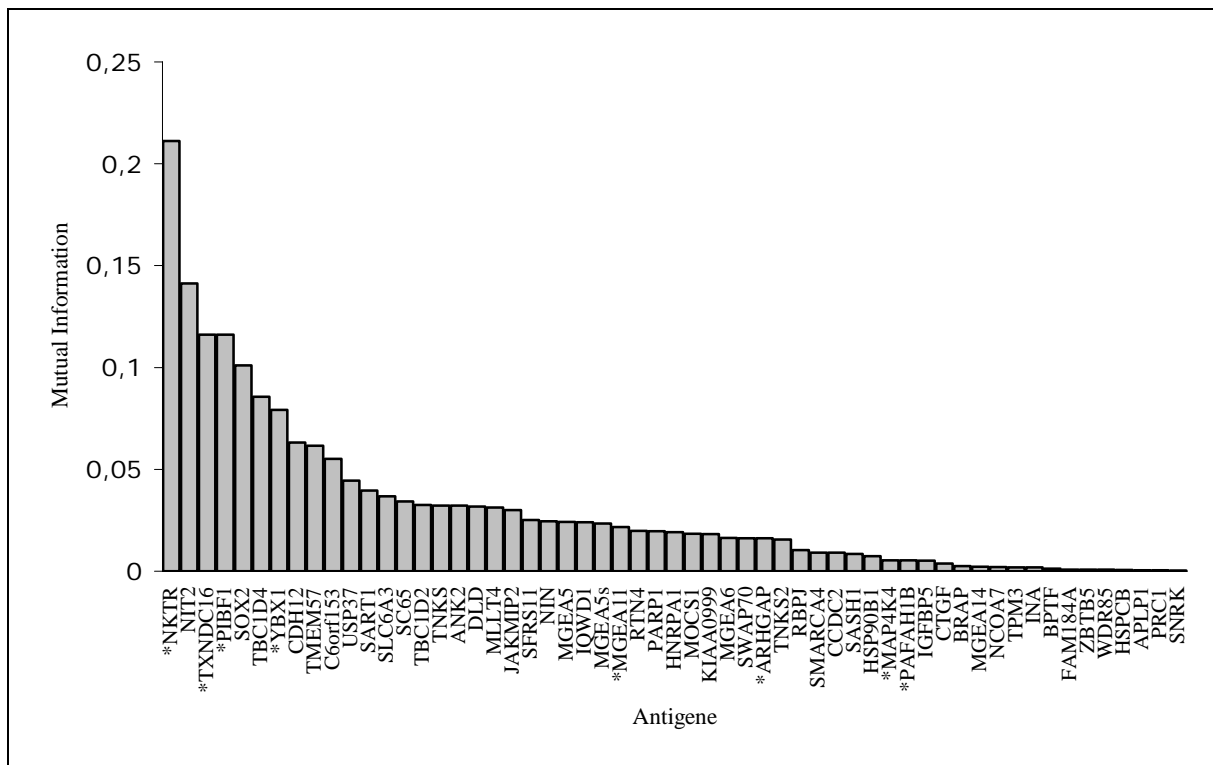


Abb. 3: Informationsgehalt Meningeom-assoziiierter Antigene; * = Meningeom-spezifische Antigene

3.1.1.2 Klassifikation von Meningeomseren

Vorrangiges Ziel dieser Untersuchung war die Differenzierung der Seren von Meningeompatienten von den Seren gesunder Kontrollprobanden anhand ihrer Seroreaktivitätsprofile. Des Weiteren sollte diese Differenzierung auch für jeden WHO-Grad separat versucht werden, d. h. es sollten Patienten mit *common-type* Meningeomen von Kontrollen, Patienten mit atypischen Meningeomen von Kontrollen und Patienten mit anaplastischen Meningeomen von Kontrollen mithilfe der Seroreaktivitätsprofile statistisch unterschieden werden. Hierfür sollten zunächst verschiedene statistische Lernverfahren getestet werden, um so eine möglichst hohe Sensitivität und Spezifität zu erreichen. Ebenso sollte die minimale Anzahl an Antigenen bestimmt werden, welche für eine optimale Trennung von Meningeomseren und Kontrollseren benötigt wird.

Nach der Bestimmung der Seroreaktivität für die 57 Meningeom-assoziierten Antigene in Seren von Meningeompatienten und gesunden Kontrollprobanden wurde versucht, die Seren der Meningeompatienten anhand ihres Seroreaktivitätsmusters von den Seren gesunder Kontrollen mithilfe statistischer Methoden zu trennen. Hierfür wurde in Zusammenarbeit mit dem Zentrum für Bioinformatik in Saarbrücken (Lehrstuhl Prof. Lenhof) das Webtool

„SePACS“ („*Seroreactivity Profile Classification Service*“) entwickelt [Keller et al., 2007], welches die Trennung von zwei Gruppen von Seren anhand von Seroreaktivitätsprofilen statistisch berechnet (weitere Erläuterungen zu den einzelnen Berechnungen finden sich in Material und Methoden, Kapitel 2.5.2 und Keller et al., 2007). Die Klassifikationsresultate sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Unter Verwendung aller 57 Meningeom-assoziierten Antigene wurde eine Spezifität von 96,2 %, eine Sensitivität von 84,5 % und eine Genauigkeit von 90,3 % für die Trennung der 93 Meningeomseren von den 90 Kontrollseren erreicht. Eine Spezifität (Rate der Richtig-Negativen) von 96,2 % bedeutet, dass 96,2 % der von dem statistischen Modell als Kontrollseren klassifizierten Seren tatsächlich Kontrollseren sind. Eine Sensitivität (Rate der Richtig-Positiven) von 84,5 % gibt an, dass 84,5 % der von dem Modell als Meningeomseren klassifizierten Seren auch in Wirklichkeit Meningeomseren sind. Die Genauigkeit von 90,3 % gibt die Korrektorklassifizierungsrate wieder, d. h. dass 90,3 % der getesteten Seren von dem Modell korrekt als Meningeom- bzw. Kontrollserum klassifiziert wurden. Für die Trennung von WHO I Meningeomen von allen Kontrollen wurden sogar noch höhere Werte von 98,6 %, 87,5 % und 95,2 % für Spezifität, Sensitivität und Genauigkeit erreicht. Die Resultate für die Trennung von WHO II Meningeomseren bzw. WHO III Meningeomen von allen gesunden Kontrollen erreichten geringfügig schlechtere Ergebnisse.

Tab. 5: Klassifikation von Meningeomen mittels serologischem Spotassay I

Klassifikation	Spezifität [%]	Sensitivität [%]	Genauigkeit [%]
Meningeom vs. Gesund	96,2	84,5	90,3
WHO I vs. Gesund	98,6	87,5	95,2
WHO II vs. Gesund	98,8	67,6	91,8
WHO III vs. Gesund	97,9	72,2	92,1

In Abbildung 4 ist das Klassifikationsergebnis von Meningeomen gegenüber Kontrollen grafisch dargestellt. Aufgetragen ist hier der Logarithmus des Quotienten der bedingten Wahrscheinlichkeiten (s. Material und Methoden, Kapitel 2.5.2) für alle 183 Seren (93 Meningeomseren, 90 Kontrollseren), wobei „0“ jeweils ein Kontrollserum und „1“, „2“, und „3“ jeweils ein Meningeomserum von WHO-Grad I, II bzw. III anzeigen. Wenn die Wahrscheinlichkeit $P(M|A)$, dass es sich bei dem getesteten Serum X um ein Meningeomserum handelt, größer ist als die Wahrscheinlichkeit $P(N|A)$, dass es sich bei diesem Serum um ein Kontrollserum handelt, so ist der Quotient der Wahrscheinlichkeiten $Q(A)=P(M|A)/P(N|A)$ größer als 1. Damit ist der Logarithmus des Quotienten $Q(A)$ größer als 0. Im umgekehrten Fall, d. h. die Wahrscheinlichkeit für ein Kontrollserum ist größer als die

Wahrscheinlichkeit für ein Meningeomserum, ist der Logarithmus des Quotienten kleiner 0. In der Grafik ist deutlich zu erkennen, dass die überwiegende Mehrheit der Kontrollseren unter der grünen Nulllinie liegen, also von dem Modell korrekt als Kontrollseren klassifiziert wurden. Umgekehrt liegt die Mehrzahl der Meningeomseren oberhalb dieser Nulllinie, was bedeutet, dass diese von dem Modell korrekt als Meningeomseren klassifiziert wurden. Insgesamt gab es zwei falsch-positive Normalseren, d. h. Seren, die von dem Modell als Meningeomserum klassifiziert wurden, welche aber tatsächlich Normalseren sind, sowie 14 falsch-negative Meningeomseren (vier WHO-Grad I, fünf WHO-Grad II und fünf WHO-Grad III), d. h. Seren, welche von dem Modell als Normalserum klassifiziert wurden, bei denen es sich aber tatsächlich um Seren von Meningeompatienten handelte.

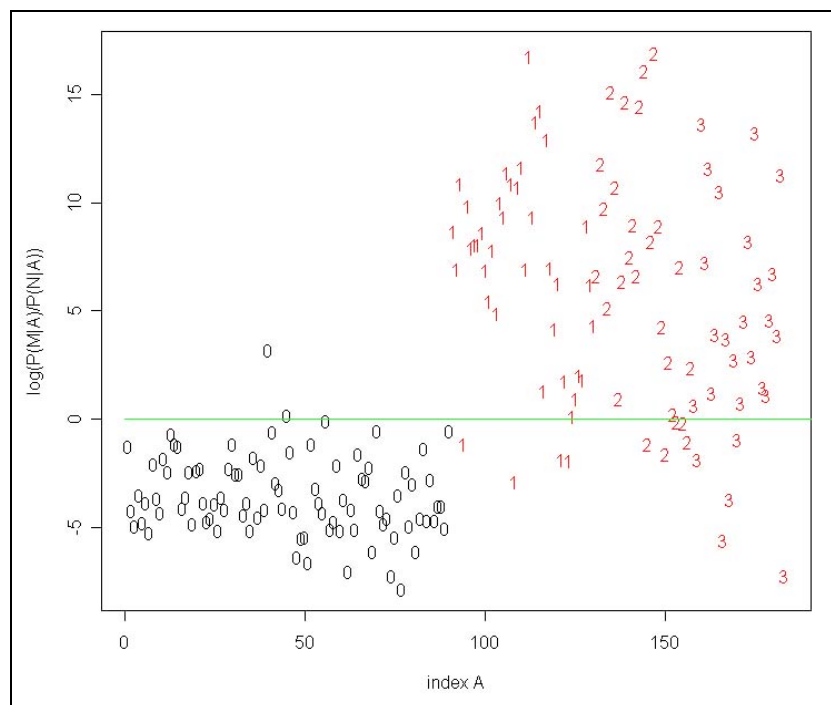


Abb. 4: Klassifikation von Meningeomen mittels serologischem Spotassay: Logarithmus des Quotienten Q von $P(M|A)$ über $P(N|A)$ für alle 183 Seren. Normalseren werden als 0, Meningeomseren als 1, 2, bzw. 3 nach ihrem WHO-Grad bezeichnet.

Anschließend wurde mithilfe einer sogenannten *Subset Selection* versucht eine bestmögliche Trennung von Meningeom- und Kontrollseren mit der geringstmöglichen Anzahl an Antigenen zu erreichen (siehe Keller et al., 2007). Diese Betrachtung wurde auch für jeden WHO-Grad separat durchgeführt, die Ergebnisse sind in Tabelle 6 aufgelistet. Um die 93 Meningeome von den 90 Kontrollen bestmöglich zu trennen, wurde ein Subset von 38 Antigenen benötigt. Anhand der Seroreaktivität dieser 38 Antigene wurde eine Spezifität von 96,4 %, eine Sensitivität von 85,1 % und eine Genauigkeit von 90,6 % erreicht. Somit konnten mit nur 38 der ursprünglich 57 Meningeom-assoziierten Antigene insgesamt 90,6 %

aller getesteten Seren richtig klassifiziert werden. Für eine Trennung von WHO I Meningeomen von allen Kontrollen mit einer Spezifität von 97,5 %, einer Sensitivität von 91,3 % und einer Genauigkeit von 95,6 % wurden sogar nur 12 der 57 Antigene benötigt.

Tab. 6: Klassifikation von Meningeomen mittels serologischem Spotassay II

Klassifikation	Anzahl Antigene	Spezifität [%]	Sensitivität [%]	Genauigkeit [%]
Meningeom vs. Gesund	38	96,4	85,1	90,6
WHO I vs. Gesund	12	97,5	91,3	95,6
WHO II vs. Gesund	36	98,9	70,1	92,2
WHO III vs. Gesund	53	97,9	73,9	92,5

Diese Trennung ist beispielhaft in Abbildung 5 grafisch dargestellt. Aufgetragen ist hier, ebenso wie für Abbildung 4, der Logarithmus des Quotienten der bedingten Wahrscheinlichkeiten für die betrachteten 40 WHO I Meningeomseren und die 90 Normalseren (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.5.2 und Keller et al., 2007). Alle Seren mit einem Logarithmus kleiner 0 werden als Normalseren klassifiziert, alle Seren mit einem Logarithmus größer 0 als Meningeomseren. Die Grafik zeigt, dass die Mehrheit, sowohl der Normalseren, als auch der Meningeomseren richtig klassifiziert wurden. Lediglich ein Normalserum wurde falsch-positiv und drei Meningeomseren falsch-negativ klassifiziert.

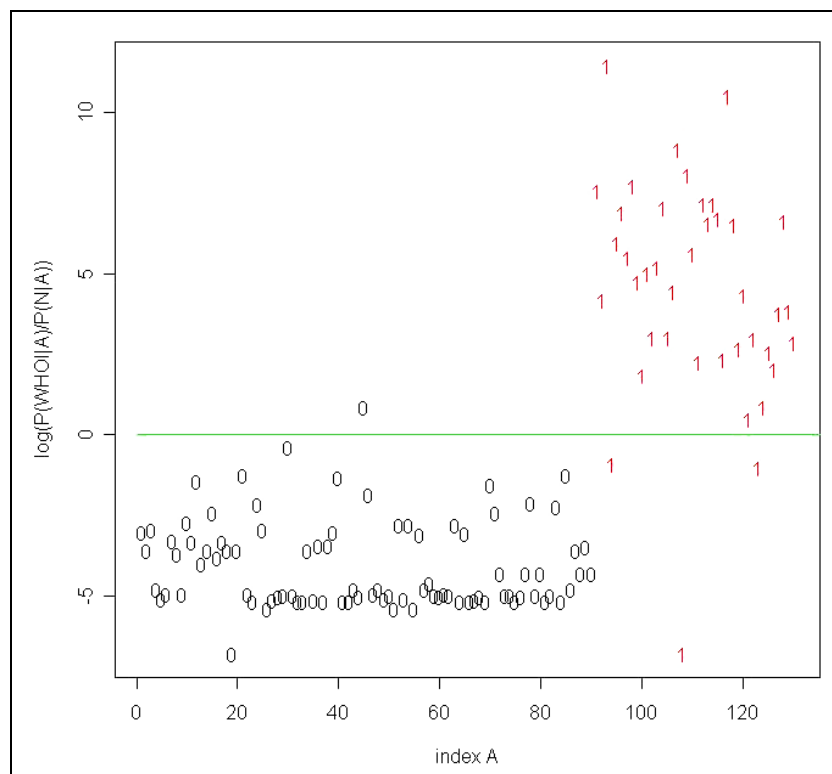


Abb. 5: Klassifikation von WHO I Meningeomen mittels serologischem Spotassay: Logarithmus des Quotienten $Q(A)$ von $P(WHOI|A)$ über $P(N|A)$ unter Verwendung von nur 12 der 57 Antigene. Normalseren werden als 0, Meningeomseren als 1 bezeichnet.

Zusammenfassend zeigte diese Untersuchung, dass sich Seroreaktivitätsprofile sehr gut zur Klassifikation von Meningeomen eignen. Meningeome konnten mit hoher Sensitivität und Spezifität von Kontrollseren differenziert werden. Es war sogar möglich, Meningeome eines jeden Grades separat mit vergleichbarer Sensitivität und Spezifität von gesunden Kontrollen zu trennen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Zuhilfenahme von nicht Meningeom-spezifischen Antigenen die Klassifikation von Meningeomen wesentlich erleichtert. Die Ergebnisse der gesamten Untersuchung wurden in dem Journal „*BMC Bioinformatics*“ veröffentlicht (Keller et al., 2006).

3.1.2 Genexpression in Meningeomen mittels Microarray

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Genexpression in Meningeomen. Hierfür wurden *Human Whole Genome* Expressionsarrays, welche die Expression von ca. 50.000 menschlichen Transkripten erfassen, verwendet und so die gesamte Genexpression in 24 Meningeomen (jeweils acht WHO-Grad I, II und III) und zwei Dura-mater Kontrollen untersucht. Dabei sollte zunächst die Genexpression in Meningeomen allgemein sowie in Abhängigkeit von WHO-Grad und Histomorphologie der Meningeome untersucht werden. Im Einzelnen wurde die Genexpression in allen 24 Meningeomen im Vergleich zu den Dura-Kontrollen, des Weiteren die Expression in *common-type* Meningeomen im Vergleich zu atypischen und anaplastischen Meningeomen sowie die Genexpression in fibroblastischen Meningeomen im Vergleich zu meningoethelialen und syncytialen Meningeomen genauer betrachtet.

Die praktischen Experimente der cDNA-Expressionsstudie wurden bereits während meiner Diplomarbeit durchgeführt. Im Rahmen meiner Dissertation wurden die gewonnenen Daten erstmals statistisch mithilfe des bioinformatischen Tools „*GeneTrailExpress*“ ausgewertet [Backes et al., 2007; Keller et al., 2008b]. Dieser Webservice wurde in Zusammenarbeit mit dem Zentrum für Bioinformatik in Saarbrücken speziell für die statistische Auswertung von Microarray-Daten entwickelt. „*GeneTrailExpress*“ verwendet bei der Analyse der Daten nicht nur die über- bzw. unterexprimierten Gene, sondern bezieht die Expression aller untersuchten Gene, in diesem Fall die Expression des gesamten bekannten menschlichen Genoms mit ein. Die Aussage über über- bzw. unterexprimierte Gene setzt die Wahl eines Schwellenwertes voraus, anhand dessen eine Überexpression oder Unterexpression festgemacht werden kann. Diese Wahl ist kritisch, da ein zu niedriger Schwellenwert möglicherweise Gene als überexprimiert erscheinen lässt, die lediglich großen individuellen Schwankungen ausgesetzt sind, während ein zu hoch gewählter Schwellenwert einige schwach überexprimierte Gene möglicherweise übersieht. Die Verwendung der Expressionsdaten des gesamten Genoms setzt keinen derartigen Schwellenwert voraus, was einen entscheidenden Vorteil gegenüber den Schwellenwert-abhängigen Auswertemethoden darstellt. „*GeneTrailExpress*“ detektiert signifikante Expressionsveränderungen in den verschiedenen Kategorien der Datenbanken „*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*“ (KEGG), „*Gene Ontology*“ (GO), TransFAC und TransPATH. Des Weiteren wird nach einer Häufung von expressionsveränderten Genen auf allen Chromosomenarmen gesucht.

3.1.2.1 Differenzielle Genexpression in Meningeomen

Zur Identifizierung von Genen und Signalwegen, die im Zusammenhang mit der Entstehung von Meningeomen verändert sind, wurden die Expressionsprofile von 24 Meningeomen mit den Expressionsprofilen von zwei Dura-Proben verglichen. Zunächst wurde die gesamte Genexpression betrachtet, welche hier ca. 50.000 menschliche Transkripte umfasst. Die mittlere Genexpression in Meningeomen bei Betrachtung aller untersuchten Transkripte im Vergleich zu der mittleren Genexpression in den Dura-Kontrollen ergab eine signifikant verringerte Genexpression in Meningeomen im Vergleich zu den Kontrollen (für Details zu der statistischen Berechnung, siehe Material und Methoden, Kapitel 2.5.3 bzw. Keller und Ludwig et al., 2009). Die vermehrte Unterexpression von Genen in Meningeomen zeigte sich auch an der Anzahl mehr als zweifach über- bzw. unterexprimierte Gene in Meningeomen. Es wurden insgesamt 3625 Transkripte (1729 bekannte Gene) mindestens zweifach unterexprimiert in Meningeomen, aber lediglich 2600 Transkripte (1321 bekannte Gene) mindestens zweifach überexprimiert identifiziert. Eine Übersicht über die bekannten Gene, welche in Meningeomen differenziell exprimiert werden, wurde in Tabelle D im Anhang aufgelistet, eine Auswahl befindet sich in Tabelle 7.

Tab. 7: Differenziell exprimierte Gene in Meningeomen im Vergleich zu Dura-Kontrollen

Array ID	Gene ID	Genname	Chrom. Lokalisation	Expression in Meningeomen*	
GE57732	999	CDH1	E-cadherin	16q22.1	+ 30,2
GE62630	6752	SSTR2	somatostatin receptor 2	17q24	+ 14,4
GE57092	2254	FGF9	fibroblast growth factor 9	13q11-q12	+ 12,8
GE537019	3280	HES1	hairy and enhancer of split 1	3q28-q29	+ 5,9
GE59170	652	BMP4	bone morphogenetic protein 4	14q22-q23	+ 4,0
GE81126	3397	ID1	inhibitor of DNA binding 1	20q11	+ 3,2
GE57905	3552	IL1A	interleukin 1, alpha	2q14	+ 3,0
GE699488	7483	WNT9A	wingless-type, member 9A	1q42	+ 2,6
GE60033	900	CCNG1	cyclin G1	5q32-q34	+ 2,6
GE63133	7475	WNT6	wingless-type family, member 6	2q35	+ 2,2
GE832337	8556	CDC14A	CDC14 cell division cycle 14 homolog A	1p21	+ 2,1
GE530657	3578	IL9	interleukin 9	5q31.1	+ 2,1
GE52960	8555	CDC14B	CDC14 cell division cycle 14 homolog B	9q22.33	- 2,1
GE79854	4314	MMP3	matrix metalloproteinase 3	11q22.3	- 2,4
GE784965	356	FASLG	Fas ligand	1q23	- 2,5
GE60509	3574	IL7	interleukin 7	8q12-q13	- 2,6
GE80495	4312	MMP1	matrix metalloproteinase 1	11q22.3	- 3,0
GE88806	4313	MMP2	matrix metalloproteinase 2	16q13-q21	- 3,8
GE59660	3569	IL6	interleukin 6	7p21	- 5,3
GE79235	3553	IL1B	interleukin 1, beta	2q14	- 5,6
GE61058	3586	IL10	interleukin 10	1q31-q32	- 6,7
GE62180	3576	IL8	interleukin 8	4q13-q21	- 8,2

* im Vergleich zur Durakontrolle

Einige der identifizierten, differenziell exprimierten Gene wurden bereits im Zusammenhang mit Meningeomen beschrieben. Der Transkriptionsfaktor „*hairy and enhancer of split 1*“ (HES1) gehört zu dem Notch-Signalweg, dessen Deregulation in Meningeomen bereits gezeigt wurde [Cuevas et al., 2005]. Diese Arbeit zeigte u. a. eine erhöhte Expression von HES1 in Meningeomen. Auch die Überexpression von „*E-Cadherin*“ wurde für Meningeome bereits immunhistochemisch gezeigt [Brunner et al., 2006]. Des Weiteren konnten Expressionsveränderungen in einzelnen Genen mit Funktionen im Zellzyklus (z. B. CDC14A und B sowie CCNG1), im Wnt-Signalweg (z. B. WNT9A, WNT6) sowie von verschiedenen Signalproteinen wie z. B. Interleukinen identifiziert werden.

Nach der Betrachtung einzelner differenziell exprimierter Gene in Meningeomen schloss sich die Auswertung der gesamten Expressionsprofile von Meningeomen und den Dura-Kontrollen mithilfe von „*GeneTrailExpress*“ an. Dabei sollten signifikante Anhäufungen von differenziell exprimierten Genen in den verschiedenen Kategorien der Datenbanken KEGG, GO, TransFAC und TransPATH sowie auf der Ebene der chromosomalen Lokalisation detektiert werden (Details zu der Auswertung siehe Material und Methoden, Kapitel 2.5.3 oder Keller und Ludwig et al., 2009). Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 dargestellt.

Die Analyse der Kategorien der KEGG-Datenbank ergab 13 Signalwege mit differenzieller Genexpression in Meningeomen. Zu den sieben Signalwegen mit erhöhter Expression in Meningeomen zählten u. a. „*nucleotide sugar metabolism*“ und „*ubiquinone biosynthesis*“. Die sechs Signalwege mit verringerter Expression in Meningeomen lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: Eine Gruppe stellt Signalmoleküle und Interaktion dar, u. a. „*cell adhesion molecules*“ und „*ECM-receptor interaction*“. Die andere Gruppe besteht aus Signalwegen aus dem Bereich des Immunsystems, nämlich „*complement and coagulation cascades*“ und „*natural killer cell mediated cytotoxicity*“. Die erhöhte Expression von metabolischen Signalwegen in Meningeomen lässt auf einen erhöhten Stoffwechsel in den Meningeomen schließen, was mit der verstärkten Proliferation von Tumorzellen erklärt werden kann. Die verringerte Expression von Rezeptoren und Adhäsionsmolekülen in Meningeomen zeigt eine veränderte Motilität und Verankerung von Meningeomzellen an der extrazellulären Matrix an. Die verringerte Expression von Molekülen zur Interaktion mit dem Immunsystem könnte einen Beitrag zu dem sogenannten „*tumor escape*“-Mechanismus sein. Dieser postuliert, dass Tumorzellen durch Veränderung der Expression v. a. von Proteinen an der Zelloberfläche einer Erkennung und Zerstörung durch das Immunsystem der Patienten entgehen und so weiter proliferieren können.

Tab. 8: Signifikant deregulierte Kategorien in Meningeomen im Vergleich zu Dura

Datenbank	überexprimiert in Meningeomen	unterexprimiert in Meningeomen
KEGG	Ubiquinone biosynthesis Selenoamino acid metabolism Nitrobenzene degradation Biosynthesis of steroids Nucleotide sugar metabolism Fructose and mannose metabolism Tryptophan metabolism	<u>Signaling Molecules/Interaction</u> Cell adhesion molecules (CAMs) Cytokine-cytokine receptor interaction ECM-receptor interaction Neuroactive ligand-receptor interaction <u>Immune system</u> Complement and coagulation cascades Natural killer cell mediated cytotoxicity
Transfac	-	NF-kappaB (T00590) NF-kappaB (p63) (T00594) Sp1 (T00759) ATF-47 (T01108) Asp53 (T00671) (Jun)2 (T00029) AGP/EBP (T00581)
Chromosomale Lokalisation	3p, 17q	1p, 6q, 7p, 22q, Yq

Die Analyse der TransPATH-Datenbank enthüllte keine signifikante Expressionsveränderung, während die Analyse der TransFAC-Datenbank sieben Transkriptionsfaktoren, u. a. NF-kappaB und Jun2, ergab, welche Gene regulieren, die in Meningeomen unterexprimiert vorliegen. Diese Transkriptionsfaktoren sind v. a. an der Regulation von Entzündungen sowie an vielen Signalwegen wie z. B. dem Map-Kinase-Signalweg oder der Apoptose beteiligt.

Die Analyse der GO-Datenbank ergab 670 Kategorien mit differenzieller Expression. Des Weiteren wurde eine erhöhte Anzahl an überexprimierten Genen auf den Chromosomenarmen 3p und 17q sowie eine erhöhte Anzahl an unterexprimierten Genen auf den Chromosomenarmen 1p, 6q, 7p, 22q, und Yq detektiert. Alle Ergebnisse der „GeneTrailExpress“-Analyse können online abgerufen werden (<http://genetrail.bioinf.uni-sb.de/paper/meni>). Die verringerte Expression von Genen auf 22q in Meningeomen verwundert nicht, da eine Deletion des Chromosoms 22, v. a. des langen Arms, die häufigste chromosomale Aberration in Meningeomen darstellt. Auch eine Deletion des kurzen Arms von Chromosom 1 ist eine häufige Aberration v. a. in höhergradigen Meningeomen. Da in dieser Analyse jeweils acht Meningeome jedes WHO-Grades gemeinsam untersucht wurden, war auch diese verringerte Genexpression zu erwarten.

Neben der Identifizierung einzelner, differenziell exprimierter Gene in Meningeomen konnte hier erstmals eine Gesamtanalyse der Genexpression in Meningeomen mit *state-of-the-art*-statistischen Methoden durchgeführt werden. Es konnten Hinweise auf Veränderungen in der Zellmotilität der Meningeome sowie in der Interaktion der Meningeomzellen mit dem

Immunsystem festgestellt werden. Daneben konnte für die häufigsten chromosomalen Aberrationen von Meningeomen, nämlich den Verlusten von Chromosom 22q und 1p, auch eine entsprechende Verringerung der Expression der auf diesen Chromosomen liegenden Gene nachgewiesen werden.

3.1.2.2 Differenzielle Genexpression in Meningeomen in Abhängigkeit des WHO-Grades

Zur Identifizierung von Veränderungen in der Genexpression, die möglicherweise in Zusammenhang mit der Progression in Meningeomen stehen, wurden die Expressionsprofile von ca. 50.000 Transkripten in 8 *common type* Meningeomen (WHO I) mit denen in 8 atypischen (WHO II) und 8 anaplastischen Meningeomen (WHO III) verglichen. Bei Betrachtung aller Transkripte konnte kein signifikanter Unterschied in der mittleren Genexpression in den WHO I Meningeomen im Vergleich zu den WHO II und III Meningeomen festgestellt werden. Bei der Betrachtung einzelner Transkripte wurde eine mindestens zweifache Überexpression von 673 Transkripten (326 bekannten Genen) und eine mindestens zweifache Unterexpression von 484 Transkripten (277 bekannten Genen) in WHO II und III Meningeomen im Vergleich zu WHO I Meningeomen festgestellt. Eine Übersicht über die bekannten Gene, welche in WHO II und III Meningeomen differenziell exprimiert werden, wird in Tabelle D im Anhang aufgelistet, eine Auswahl zeigt Tabelle 9.

Unter den in WHO II und III Meningeomen im Vergleich zu WHO I Meningeomen unterexprimierten Genen befand sich u. a. das Gen „*alkaline phosphatase*“ (ALPL). Ein Verlust der Expression von ALPL in höhergradigen Meningeomen ist weithin bekannt und wird als prognostischer Faktor gesehen [Bouvier et al., 2005]. Weitere differenziell exprimierte Gene zeigen Funktionen im Zellzyklus (CCNB1 und CCNB2), im Map-Kinase-Signalweg (DUSP6 und FGFR2), im TGF-beta-Signalweg (AMH und ID4) sowie im Wnt-Signalweg (WNT2B und DAAM2). Des Weiteren zeigte sich eine differenzielle Expression einiger Wachstumsfaktoren (z. B. IGF2) sowie deren Rezeptoren (z. B. TGFBR2) in atypischen und anaplastischen Meningeomen.

Tab. 9: Differenziell exprimierte Gene in WHO II / III Meningeomen im Vergleich zu WHO I Meningeomen

Array ID	Gene ID	Genname		Chrom. Lokalisation	Expression in WHOII/III Meningeomen*
GE79183	3481	IGF2	insulin-like growth factor 2	11p15.5	+ 8,1
GE62180	3576	IL8	interleukin 8	4q13-q21	+ 4,2
GE81092	1848	DUSP6	dual specificity phosphatase 6	12q22-q23	+ 2,9
GE59802	1164	CKS2	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2	9q22	+ 2,8
GE85637	3117	HLA-DQA1	MHC complex, class II, DQ alpha 1	6p21.3	+ 2,7
GE58221	268	AMH	anti-Mullerian hormone	19p13.3	+ 2,6
GE59318	4085	MAD2L1	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1	4q27	+ 2,6
GE57886	891	CCNB1	cyclin B1	5q12	+ 2,4
GE60367	90	ACVR1	activin A receptor, type I	2q23-q24	+ 2,4
GE57549	1294	COL7A1	collagen, type VII, alpha 1	3p21.1	+ 2,3
GE88565	3125	DRB3	MHC complex, class II, DR beta 3	6p21.3	+ 2,2
GE63201	1285	COL4A3	collagen, type IV, alpha 3	2q36-q37	+ 2,2
GE78964	9133	CCNB2	cyclin B2	15q22.2	+ 2,1
GE79677	3600	IL15	interleukin 15	4q31	+ 2,1
GE62988	3485	IGFBP2	insulin-like growth factor binding protein 2	2q33-q34	+ 2,1
GE57247	7048	TGFB2	transforming growth factor, beta receptor II	3p22	+ 2,1
GE61433	2263	FGFR2	fibroblast growth factor receptor 2	10q26	+ 2,0
GE56068	3400	ID4	inhibitor of DNA binding 4,	6p22-p21	+ 2,0
GE54521	3488	IGFBP5	insulin-like growth factor binding protein 5	2q33-q36	- 2,0
GE63181	7482	WNT2B	wingless-type family, member 2B	1p13	- 2,0
GE824722	3486	IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3	7p13-p12	- 2,1
GE53097	23500	DAAM2	dishevelled associated activator of morphogenesis 2	6p21.2	- 2,1
GE86121	3488	IGFBP5	insulin-like growth factor binding protein 5	2q33-q36	- 2,7
GE82491	3118	HLA-DQA2	MHC complex, class II, DQ alpha 2	6p21.3	- 2,9
GE61564	249	ALPL	alkaline phosphatase	1p36.1-p34	- 5,7
GE81222	6424	SFRP4	secreted frizzled-related protein 4	7p14.1	- 7,6

* im Vergleich zu WHO I Meningeomen

Im Anschluss an die Betrachtung der Einzelgene wurde das gesamte Expressionsprofil von WHO I Meningeomen mit dem von WHO II und III Meningeomen verglichen und von „GeneTrailExpress“ analysiert.

Die Analyse der Datenbanken KEGG, TransPATH und TransFAC ergab keine signifikant deregulierten Kategorien. Möglicherweise liegt in höhergradigen Meningeomen eine gezielte Veränderung der Genexpression von einzelnen Genen in Schlüsselpositionen wichtiger Signalwege vor und weniger eine Veränderung vieler Gene eines Signalweges. Die Analyse der GO-Datenbank wies 208 Kategorien mit signifikant veränderter Genexpression auf. Die Analyse der chromosomalen Lokalisation der über- bzw. unterexprimierten Gene ergab u. a. eine erhöhte Anzahl von überexprimierten Genen auf den Chromosomenarmen 1q, 12q, 17q und 20q sowie eine erhöhte Anzahl von unterexprimierten Genen auf den Chromosomenarmen 1p, 6q, 10q, 10p und 14q (siehe Tabelle 10). Diese Ergebnisse spiegeln die Beobachtungen der chromosomalen Aberrationen in höhergradigen Meningeomen sehr

gut wider. Atypische und v. a. anaplastische Meningeome zeigen in der Regel vielfältige chromosomale Aberrationen, sehr häufig sind hierbei Gewinne auf den Chromosomen 1q, 12q, 17q und 20q sowie Verluste auf den Chromosomen 1p, 6q, 10q, 10p und 14q. Alle signifikanten Ergebnisse können online abgerufen werden (<http://genetrail.bioinf.uni-sb.de/paper/meni>).

Tab. 10: Signifikant deregulierte Kategorien in WHO II / III Meningeomen gegenüber WHO I Meningeomen

Datenbank	überexprimiert in WHO II/III	unterexprimiert in WHO II/III
Chromosomale Lokalisation	1q, 2p, 2q, 3q, 5p, 5q, 7q, 8q, 11p, 12q, 16p, 16q, 17q, 20q, Xp	1p, 6q, 7p, 10q, 10p, 14q, 22q

Der Vergleich der Genexpression in *common type* Meningeomen mit der Genexpression in atypischen und anaplastischen Meningeomen zeigte eine Anhäufung über- bzw. unterexprimierter Gene auf Chromosomenarmen, deren Deletion bzw. Amplifikation in höhergradigen Meningeomen bereits bekannt war. Zusätzlich konnte eine Vielzahl von Genen erstmals mit der Progression von Meningeomen in Verbindung gebracht werden.

3.1.2.3 Differenzielle Genexpression in Meningeomen in Abhängigkeit der Morphologie

Zur Identifizierung von Veränderungen in der Genexpression, die möglicherweise in Zusammenhang mit der Morphologie von Meningeomen stehen, wurden die Expressionsprofile von meningoethelialen und syncytialen Meningeomen mit denen von fibroblastischen Meningeomen verglichen. Bei Betrachtung aller untersuchten Transkripte ergab sich eine signifikant erhöhte Genexpression in fibroblastischen Meningeomen im Vergleich zu den meningoethelialen und syncytialen Meningeomen (für Details zu der statistischen Berechnung siehe Material und Methoden, Kapitel 2.5.3 bzw. Keller und Ludwig et al., 2009). Insgesamt wurden in fibroblastischen Meningeomen 1340 Transkripte (518 bekannte Gene) mit mindestens zweifacher Überexpression und 618 Transkripte (401 bekannte Gene) mit mindestens zweifacher Unterexpression identifiziert. Eine Übersicht über diese Gene wird in Tabelle D im Anhang beigelegt, eine Auswahl enthält Tabelle 11.

Neben Komponenten des Wnt-Signalweges (WNT2B, WNT3) und des TGF-beta-Signalweges (BMP5, BMP7) wurden auch viele Gene, welche in der Zelladhäsion eine Rolle spielen, wie z. B. verschiedene Kollagene, in fibroblastischen Meningeomen differenziell exprimiert.

Tab. 11: Differenziell exprimierte Gene in fibroblastischen Meningeomen im Vergleich zu meningoethelialen und syncytialen Meningeomen

Array ID	Gene ID	Genname		Chrom. Lokalisation	Expression in fibroblastischen Meningeomen*
GE83609	85407	NKD1	naked cuticle homolog 1	16q12	+ 3,2
GE59565	2487	FRZB	frizzled-related protein	2qter	+ 2,9
GE62490	4803	NGFB	nerve growth factor, beta	1p13.1	+ 2,8
GE57506	1301	COL11A1	collagen, type XI, alpha 1	1p21	+ 2,7
GE58941	288	ANK3	ankyrin 3	10q21	+ 2,7
GE63181	7482	WNT2B	wingless-type family, member 2B	1p13	+ 2,6
GE86401	1298	COL9A2	collagen, type IX, alpha 2	1p33-p32	+ 2,5
GE54106	9540	TP53I3	tumor protein p53 inducible protein 3	2p23.3	+ 2,4
GE57126	3680	ITGA9	integrin, alpha 9	3p21.3	+ 2,2
GE86328	7473	WNT3	wingless-type family, member 3	17q21	+ 2,2
GE88361	127534	GJB4	gap junction protein, beta 4	1p34.3	+ 2,1
GE59762	655	BMP7	bone morphogenetic protein 7	20q13	+ 2,0
GE79024	2353	FOS	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	14q24.3	- 2,0
GE56613	653	BMP5	bone morphogenetic protein 5	6p12.1	- 2,0
GE871979	4950	OCLN	occludin	5q13.1	- 2,1
GE81387	1005	CDH7	cadherin 7, type 2	18q22-q23	- 2,1
GE59420	990	CDC6	CDC6 cell division cycle 6	17q21.3	- 2,1
GE81834	2246	FGF1	fibroblast growth factor 1	5q31	- 2,1
GE80303	154	ADRB2	adrenergic, beta-2-, receptor	5q31-q32	- 2,1
GE59753	1123	CHN1	chimerin 1	2q31-q32.1	- 2,1
GE57767	1299	COL9A3	collagen, type IX, alpha 3	20q13.3	- 2,3
GE54248	3679	ITGA7	integrin, alpha 7	12q13	- 2,3
GE631286	153	ADRB1	adrenergic, beta-1-, receptor	10q24-q26	- 2,3
GE88385	2702	GJA5	gap junction protein, alpha 5,	1q21.1	- 2,4
GE54108	9537	TP53I11	tumor protein p53 inducible protein 11	11p11.2	- 2,5
GE58245	287	ANK2	ankyrin 2, neuronal	4q25-q27	- 2,6
GE60333	8626	TP73L	tumor protein p73-like	3q28	- 3,1
GE85637	3117	HLA-DQA1	MHC complex, class II, DQ alpha 1	6p21.3	- 3,4
GE88282	10804	GJB6	gap junction protein, beta 6	13q11-q12.1	- 8,5

* im Vergleich zu meningoethelialen und syncytialen Meningeomen

Nach der Analyse einzelner differenziell exprimierter Gene wurde das gesamte Expressionsprofil von fibroblastischen Meningeomen mit dem Expressionsprofil von meningoethelialen und syncytialen Meningeomen verglichen und mithilfe von „GeneTrailExpress“ analysiert. Die Analyse der KEGG- und TransPATH-Datenbank ergab keine signifikant deregulierten Kategorien. Dies deutet darauf hin, dass die Expression in Meningeomen unterschiedlicher Morphologie bei Betrachtung einzelner Gene zwar unterschiedlich ist, sich aber kein generelles Muster der Anhäufung von differenziell exprimierten Genen in bestimmten Signalwegen zeigt. Die Analyse der TransFAC-Datenbank zeigte zwei Transkriptionsfaktoren, nämlich Sp1 und AGP/EBP, die Gene regulieren, welche in fibroblastischen Meningeomen vermehrt unterexprimiert werden. Der Transkriptionsfaktor AGP/EBP reguliert u. a. die Expression von Akutphaseproteinen [Chang et al., 1995]. Die Analyse der GO-Datenbank ergab 108 signifikant deregulierte Kategorien. Die Analyse der

chromosomalen Lage der differenziell exprimierten Gene zeigte acht Chromosomenarme, auf denen vermehrt überexprimierte Gene liegen, u. a. 1p und 10p, sowie elf Chromosomenarme, auf denen vermehrt unterexprimierte Gene liegen, u. a. 2p und 22q (siehe Tabelle 12). Alle signifikanten Ergebnisse können online abgerufen werden (<http://genetrail.bioinf.uni-sb.de/paper/meni>).

Tab. 12: Signifikant deregulierte Kategorien in meningoethelialen und syncytialen Meningeomen gegenüber fibroblastischen Meningeomen

Datenbank	überexprimiert in fibroblastischen Meningeomen	unterexprimiert in fibroblastischen Meningeomen
Transfac	-	Sp1 (T08484) AGP/EBP (T00581)
Chromosomale Lokalisation	1p, 3p, 4p, 10p, 10q, 14q, 18p, 18q	2p, 8p, 8q, 11q, 12q, 15q, 16p, 16q, 17q, 19p, 22q

Die Analyse der Genexpression von Meningeomen im Zusammenhang mit der Morphologie ergab Unterschiede in der Genexpression von fibroblastischen Meningeomen im Vergleich zu meningoethelialen und syncytialen Meningeomen.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit ein Beitrag zum weiteren Verständnis der zellulären Veränderungen in Meningeomen generell, als auch im Zusammenhang mit Progression und Morphologie in Meningeomen geleistet werden. Es konnten Veränderungen auf cDNA-Ebene gezeigt werden, welche bereits auf chromosomaler Ebene in Meningeomen bekannt waren, wie z. B. Verluste der Genexpression auf den Chromosomen 22q oder 1p. Des Weiteren konnte für einige Signalwege eine Verbindung zu der Entstehung von Meningeomen aufgezeigt werden, welche bisher noch nicht bekannt war, wie z. B. für den Signalweg der „*natural killer cell mediated cytotoxicity*“. Die gesamte Analyse der Genexpression in Meningeomen wurde in dem Journal „*International Journal of Cancer*“ veröffentlicht [Keller und Ludwig et al., 2009].

3.1.3 Zusammenhang zwischen Immunogenität und Expression von Meningeom-assoziierten Antigenen

In diesem Teilaspekt meiner Arbeit soll geklärt werden, ob die Überexpression eines Gens in Meningeomen möglicherweise mit der Immunantwort gegen das zugehörige Protein in Meningeompatienten in Zusammenhang steht. Hierzu wurden die in Abschnitt 3.1.1 aufgeführten Ergebnisse aus den immunologischen Untersuchungen der Meningeom-assoziierten Antigene mit der Genexpression dieser Antigene in 24 autologen Meningeomen verglichen. Zunächst wurden 22 der 57 Antigene von der Betrachtung ausgeschlossen, da diese in weniger als fünf der 24 betrachteten Meningeompatienten eine Autoantikörperantwort auslösten. Die Expression der verbleibenden 35 Meningeom-assoziierten Antigene wurde anhand der Microarray-Ergebnisse aus Kapitel 3.1.2 ermittelt. Die erhaltenen Daten wurden auf zwei Arten analysiert: Zunächst wurde die Expression der 35 Meningeom-assoziierten Antigene mit der Seroreaktivität dieser Antigene korreliert. Anschließend wurde die generelle mRNA-Expression in Zusammenhang mit dem Autoantikörperprofil gebracht.

3.1.3.1 Expression Meningeom-assoziiierter Antigene

Zur Überprüfung der These, dass Überexpression bei der Immunogenität von Tumor-assoziierten Antigenen eine Rolle spielt, wurde im Folgenden die mRNA-Expression von 35 Meningeom-assoziierten Antigenen in 24 Meningeompatienten, deren Seroreaktivität gegenüber diesen Antigenen bereits bekannt war, mit dieser in Bezug gesetzt (siehe Material und Methoden, 2.5.4.1 Überexpression von Meningeom-assoziierten Antigenen). Im Folgenden bedeutet seropositiv, dass das Serum des getesteten Patienten Autoantikörper gegenüber dem betrachteten Antigen enthält. Umgekehrt bedeutet seronegativ, dass keine Autoantikörper gegen das betrachtete Antigen im Serum des Patienten nachweisbar waren.

Zunächst wurde der Mittelwert der Expressionswerte eines Antigens in allen seropositiven Patienten sowie in allen seronegativen Patienten ermittelt und ein Quotient seropositiv / seronegativ gebildet. Diese Berechnung wurde sowohl für alle 24 Meningeompatienten, als auch für die jeweils acht Patienten eines jeden WHO-Grades separat durchgeführt. Um die statistische Signifikanz der Aussagen zu testen, wurde ein Permutationstest durchgeführt, in dem die Expressionswerte aller Antigene zufällig zu diesen

zugeordnet wurden und daraus die entsprechenden Expressionsquotienten für seropositive und seronegative Patienten gebildet wurden. Die Ergebnisse der Berechnung zeigt Tabelle 13. Bei Betrachtung aller Meningeome sowie bei alleiniger Betrachtung der WHO II und WHO III Meningeome zeigte sich keine signifikante Überexpression von Antigenen in seropositiven Patienten. Im Gegensatz dazu zeigt der Quotient der mittleren Expression der Antigene in seropositiven WHO I Meningeomen im Vergleich zu seronegativen WHO I Meningeomen einen Wert von 1,35 und deutet somit auf eine erhöhte Expression von seropositiven Antigenen in Grad I Meningeomen hin.

Tab. 13: Mittlere Expression der Antigene in Meningeomen. Mittelwerte der Antigenexpression für jeden Tumorgrad sowie Mittelwert der Ergebnisse der Kontrollexperimente. p-Wert der für signifikanten Unterschied zwischen Kontrolle und Experiment

	Alle Meningeome	WHO I	WHO II	WHO III
Mittelwert	1,06	1,35	0,96	1,24
Mittelwert (Kontrolle)	1,08	1,11	1,06	1,3
p-Wert	0,39	0,02	0,13	0,07

Fett = statistisch signifikant

Der Mittelwert des Quotienten der Permutationskontrolle lag bei 1,1, wobei der Unterschied zwischen diesem Quotienten und den realen Daten durch einen Wilcoxon-Mann-Whitney-Test als statistisch signifikant erachtet werden kann ($p = 0,018$). Somit konnte für die WHO I Meningeome ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Immunogenität von Meningeom-assoziierten Antigenen und deren Überexpression im autologen Patienten erstmals nachgewiesen werden. Das Ergebnis der Analyse ist als Histogramm-Blot in Abbildung 6 A dargestellt.

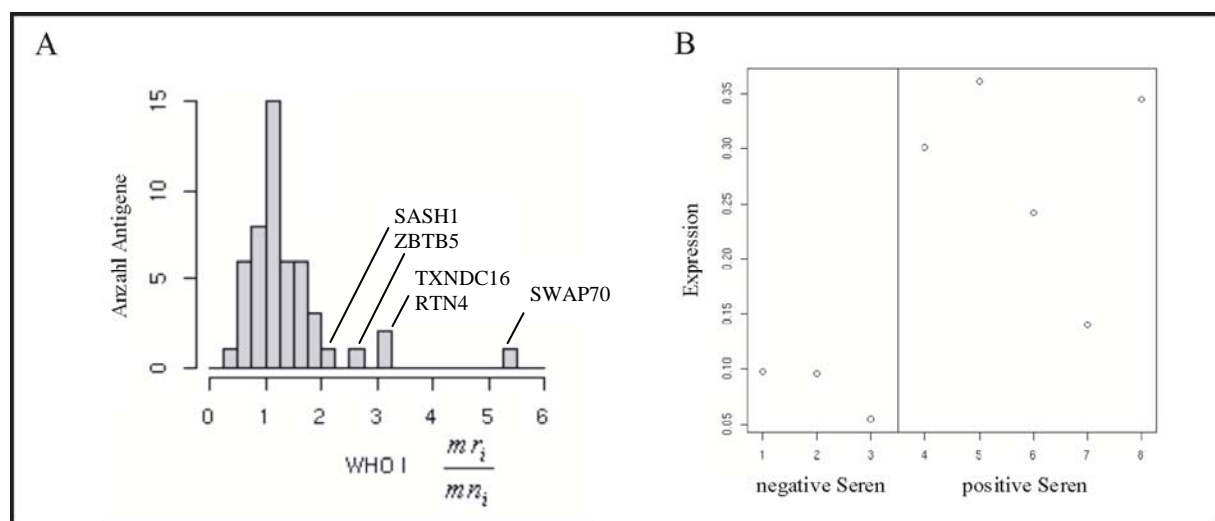


Abb. 6: mRNA Expression Meningeom-assoziiierter Antigene in Abhängigkeit von der Seroreaktivität A: Vergleich der mRNA Expression der seropositiven und seronegativen Antigene: Histogramm-Blot der Quotienten (Quotient des Medians der Expressionswerte eines Antigens i in seropositiven Patienten $m r_i$ und dem Median der Expressionswerte in seronegativen Patienten $m n_i$) (x-Achse) und der Anzahl der Antigene mit dem entsprechenden Quotienten (y-Achse). B: mRNA Expressionswerte des Antigens TXNDC16 in 8 WHO I Meningeomen, von denen drei seronegativ und fünf seropositiv waren

Die Antigene mit den höchsten Expressionsquotienten, also die Antigene, welche in seropositiven Patienten mit *common type* Meningeomen am stärksten überexprimiert sind, sind die Antigene „*thioredoxin domain containing 16*“ (TXNDC16; 3,1), „*SAM and SH3 domain containing 1*“ (SASH1; 2,1), „*zinc finger and BTB domain containing 5*“ (ZBTB5; 2,6), „*reticulon 4*“ (RTN4; 3,0), und „*SWAP-70 protein*“ (SWAP70; 5,3) (siehe Abb. 6 A). Die Expressionswerte für TXNDC16 sind exemplarisch in Abbildung 6 B dargestellt. Die Expressionswerte der drei seronegativen Patienten liegen zwischen 0,05 und 0,1, während die Expressionswerte der seropositiven Patienten mit 0,14 bis 0,36 deutlich höher liegen. Dieser Zusammenhang von erhöhter Expression und positiver Seroreaktivität konnte für keines der 35 Antigene bei Betrachtung von WHO II und III Meningeomen hergestellt werden.

Neben der Einzelanalyse der Expression jedes einzelnen Antigens in Meningeomen wurde eine globale Analyse der Antigenexpression in Meningeomen durchgeführt (siehe Material und Methoden, 2.5.4.1 Überexpression von Meningeom-assoziierten Antigenen). Hierbei wurden die Expressionswerte seropositiver Antigene in allen Patienten mit denen von seronegativen Antigenen in allen Patienten verglichen. Das Ergebnis ist als Histogramm-Blot der normalisierten Expressionswerte (z-Scores) gegenüber der Anzahl an Antigenen mit dem entsprechenden Expressionswert in Abbildung 7 dargestellt.

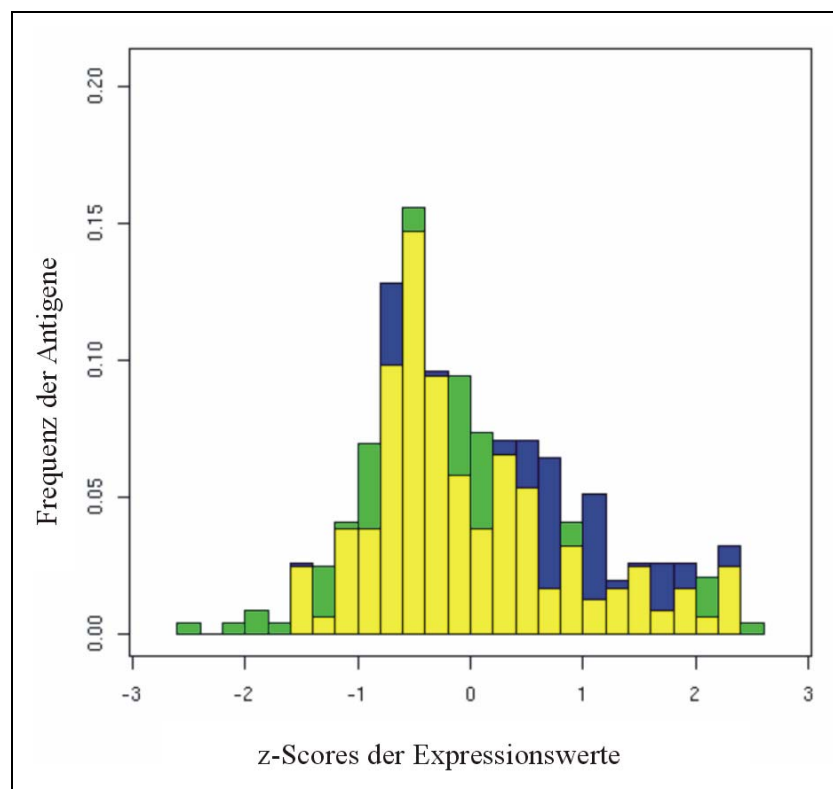


Abb. 7: Vergleich der mRNA Expression seronegativer (grün) und seropositiver Antigene (blau) in WHO I Meningeomen. Die x-Achse zeigt die normalisierten Expressionswerte (z-Score) und die y-Achse die Frequenz der Antigene mit dem entsprechenden Expressionswert.

Die Abbildung zeigt, dass die Expression der seropositiven Antigene (blau) höhere Werte aufweist als die Expression seronegativer Antigene (grün). Der Mittelwert der Expression liegt bei 0,07 für seronegative Antigene und 0,1 für seropositive Antigene. Der Unterschied ist nach einem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test mit einem p-Wert von 0,029 statistisch signifikant. Somit konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression von Antigen-codierenden Genen höher ist, wenn eine Seroreaktivität gegen dieses Antigen im autologen Patienten vorliegt.

3.1.3.2 Veränderung der Gesamtexpression in Meningeomen in Abhängigkeit von der Seroreaktivität

In einer zweiten Analyse wurde die Gesamtexpression aller Gene in Abhängigkeit von der Seroreaktivität gegenüber einem bestimmten Antigen untersucht. Hierfür wurde die Anzahl über- und unterexprimierter Gene bei dem Vergleich der Genexpression in Meningeomen, die für ein bestimmtes Antigen seropositiv waren, mit der Genexpression in Meningeomen, die für dieses Antigen seronegativ waren, betrachtet. Die Analyse ist in Abbildung 8 skizziert. Für jedes der 35 Antigene wurden die Microarrays der 24 Meningeompatienten in zwei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe enthielt die Microarrays der seropositiven Patienten, während die zweite Gruppe die Microarrays der seronegativen Patienten enthielt. Für jedes der ca. 50.000 Transkripte wurde anschließend der Median der Expressionswerte für beide Gruppen errechnet und der Quotient dieser Mediane ermittelt. Ein Quotient größer 1 zeigt somit eine erhöhte Expression des Transkriptes in seropositiven Patienten an, während ein Quotient kleiner 1 eine schwächere Expression des betrachteten Transkriptes in seropositiven Patienten anzeigt. Für jedes der 35 Antigene konnte so die genaue Anzahl von über- oder unterexprimierten Genen in den seropositiven Patienten ermittelt werden. Als Schwellenwerte für Über- bzw. Unterexpression wurde ein Expressionsunterschied um den Faktor 2 bzw. 5 festgelegt.

Zur statistischen Absicherung der Ergebnisse wurde eine zweite Berechnung durchgeführt, bei der die Einteilung der 24 Microarrays in die seropositive bzw. seronegative Gruppe rein zufällig war. Diese zufällige Einteilung wurde 1000-mal wiederholt und jeweils die Anzahl an um die Faktoren 2 bzw. 5 über- bzw. unterexprimierten Genen in einem Histogramm festgehalten. Liegt die Anzahl an überexprimierten Genen bei positiver Seroreaktivität gegenüber einem bestimmten Antigen statistisch signifikant über der Anzahl an

überexprimierten Genen aus den Zufallsexperimenten, so wurde eine generelle Hochregulierung der Genexpression in diesen Meningeomen angenommen.

Für das Antigen „family with sequence similarity 184, member A“ (FAM184A, c6orf60) konnte eine signifikant erhöhte Anzahl an mehr als zweifach überexprimierten Genen festgestellt werden ($p = 0,00012$). In Meningeomen von Patienten, die seropositiv für FAM184A waren, wurden 590 Transkripte mit mehr als zweifacher Überexpression festgestellt, während bei den 1000 Permutationstests im Mittel nur 261 Transkripte (Standardabweichung 72) mit mehr als zweifacher Überexpression auftraten. In Abb. 8 unten ist das Histogramm dieser Analyse dargestellt.

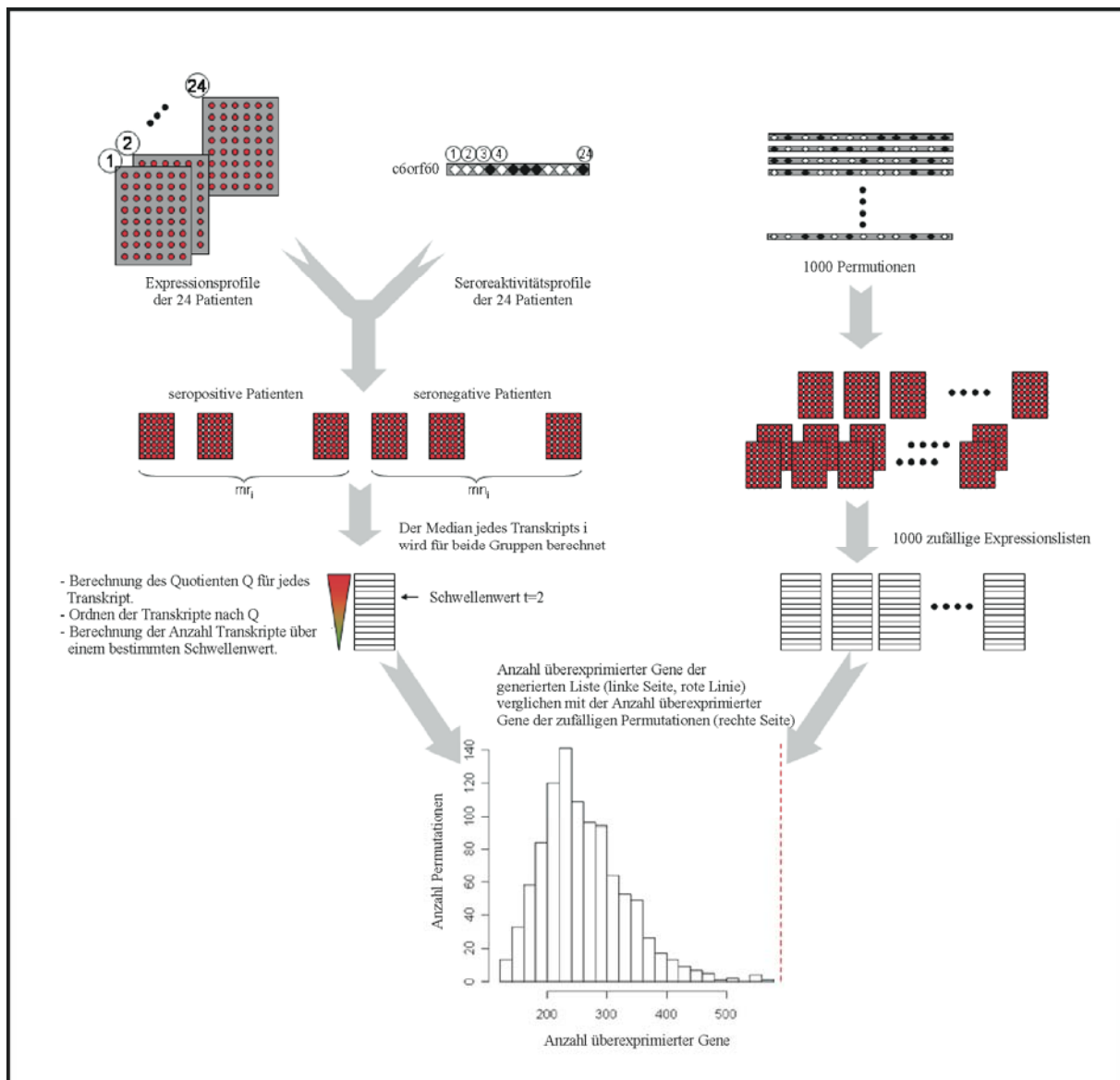


Abb. 8: Veränderung der Genexpression in Meningeomen in Abhängigkeit von der Seroreaktivität. Unten: Bei Betrachtung von Meningeomen, die seropositiv für FAM184A (c6orf60) waren, sind 590 Transkripte mehr als 2-fach überexprimiert (rote Linie). Im Mittel sind nur 261 Transkripte mehr als zweifach überexprimiert.

Des Weiteren wurden 37 Transkripte mehr als fünffach überexprimiert in Meningeomen von Patienten, die seropositiv für KIAA0999 waren, festgestellt, während in den Kontrollpermutationen im Mittel nur 14 Transkripte (Standardabweichung 6,6) eine solche Überexpression zeigten ($p = 0,008$).

Die Analyse bezüglich des Zusammenhangs zwischen Immunogenität und Expression Meningeom-assoziiierter Antigene ergab zum einen, dass die globale Genexpression in Meningeomen in Zusammenhang mit einer positiven Autoantikörperantwort gegenüber Meningeom-assoziierten Antigenen gebracht werden kann. Ebenso konnte eine Überexpression Meningeom-assoziiierter Antigene in *common type* Meningeomen von Patienten, die eine positive Serumreaktion gegenüber diesen Antigenen aufwiesen, festgestellt werden. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in dem Journal „*Gene Therapy*“ veröffentlicht [Keller und Ludwig et al., 2008a].

3.1.4 Seroreaktivität in Meningeomen mittels Proteinmakroarray-Screening

Ein weiteres, grundlegendes Ziel dieser Arbeit war die Verbesserung der Klassifizierung von Meningeomen mittels komplexen Seroreaktivitätsprofilen. Von der Arbeitsgruppe um Comtesse et al. wurden 57 Meningeom-assoziierte Antigene mithilfe des SEREX-Verfahrens identifiziert. Die Detektion von Autoantikörpern mit diesem Verfahren ist jedoch aufwendig und ist nur in begrenztem Maße für Hochdurchsatz-Untersuchungen geeignet. Des Weiteren stellen 57 Meningeom-assoziierte Antigene zwar eine gute Grundlage für eine Differenzierung von Meningeomen aufgrund von Seroreaktivität dar, zur Erhöhung der Sensitivität und Spezifität der Klassifikation bei Anwendung komplexer statistischer Lernmethoden sollte die Anzahl an untersuchten Antigenen jedoch maximiert werden. Daher sollten in diesem Teil meiner Arbeit weitere Meningeom-assoziierte Antigene identifiziert werden, und zwar mit einem Verfahren, das einen Hochdurchsatz erlaubt. Hierfür wurde die hex1-Expressionsbank gewählt, welche aus ca 38.000 in *E.coli* einklonierten humanen cDNA-Sequenzen besteht [Büssow et al., 1998]. Die Identität dieser Klone wurde bereits durch Sequenzierung ermittelt und die Klone liegen vereinzelt vor, d. h. sie können, analog zu dem Vorgehen bei Microarrays, mithilfe eines Roboters einzeln auf eine proteinbindende Membran gespottet werden und anschließend mit Patientenserum untersucht werden. Die weitere Vorgehensweise ist in Abbildung 9 skizziert.

Zur Identifizierung einer möglichst großen Zahl an Tumor-assoziierten Antigenen wurde die hex1-Expressionsbank, bestehend aus ca 38.000 antigentragenden Klonen, mit insgesamt 34 Serumpools von Patienten mit verschiedenen Tumor- und Nicht-Tumorerkrankungen untersucht, darunter auch jeweils sechs Serumpools von Patienten mit Meningeomen und Gliomen. Zunächst wurden die 38.000 Klone auf eine proteinbindende Membran gespottet und die Expression der einklonierten Sequenz induziert. Anschließend wurde die Membran, jeweils mit den Serumpools inkubiert und gebundene humane Autoantikörper mittels eines Enzym-markierten sekundären Antikörpers, der gegen humane Antikörper gerichtet ist, detektiert. Die 34 Serumpools konnten insgesamt 1827 immunogene Klone detektieren.

Diese 1827 antigentragenden Klone wurden auf einem Proteinmakroarray zusammengeführt, der anschließend mit Seren von einzelnen Patienten weiter untersucht wurde. Insgesamt wurden 53 Seren von Meningeompatienten, 57 Seren von Gliompatienten und 60 Seren von gesunden Kontrollpersonen auf Autoantikörper gegenüber den 1827 immunogenen Klonen

untersucht. Die Auswertung der erhaltenen Signale erfolgte vollautomatisch am Zentrum für Bioinformatik in Saarbrücken. Die vollautomatische Bildauswertung stellt einen großen Vorteil gegenüber der Auswertung der serologischen Spotassays dar. Die serologischen Spotassays ließen nur eine Ja/Nein-Aussage über das Vorhandensein von Autoantikörpern in den untersuchten Seren zu, während die automatische Bildauswertung eine Aussage über die Stärke der Immunantwort gegenüber dem untersuchten Antigen zulässt. Dies erlaubt die Verwendung komplexerer statistischer Lernverfahren, was wiederum der Effizienz der Differenzierung zuträglich ist. Die Signalintensitäten eines jeden der 1827 immunogenen Klone, welche diesen von der Bildauswertungs-Software zugeteilt wurde, wurden anschließend normalisiert (siehe Material und Methoden, Abschnitt 2.5.5). Nach der Normalisierung wurden 1417 immunogene Klone für die Berechnung der Seroreaktivitätsmuster verwendet. Mithilfe dieser antigenträgenden Klone und einer linearen Support-Vektor-Maschine als statistischem Lernverfahren wurde anschließend eine Differenzierung der Seren von Meningeompatienten von den Seren von gesunden Kontrollprobanden aufgrund ihres jeweiligen Seroreaktivitätsmusters versucht.

Neben der reinen Klassifikation von Meningeomen aufgrund ihrer Seroreaktivität gegenüber diesen Antigenen sollten in diesem Zuge auch weitere Meningeom-assoziierte Antigene identifiziert werden, welche möglicherweise weitere Einblicke in die Pathologie der Meningeome erlauben. Hierbei sollten zum einen Antigene betrachtet werden, die in hoher Frequenz eine Autoantikörperantwort in Meningeomen auslösen, nicht aber in gesunden Probanden. Zum anderen sollten auch die Antigene näher beleuchtet werden, die sich besonders gut für die Differenzierung von Meningeomen von Gesunden eignen.

Um weiterhin die Frage zu klären, ob sich diese Seroreaktivitätsmuster nicht nur zur Identifizierung von Meningeomen im Vergleich zu Gesunden eignen, sondern ob sogar eine Unterscheidung der Meningeome von anderen Tumoren des gleichen Organs möglich ist, wurde auch eine Differenzierung der Seren der Meningeompatienten von ebenso untersuchten Seren von Gliompatienten versucht.

Identifizierung krankheitsrelevanter Autoantigene

Screening einer Expressionsbank mit 34 Serumpools,
u.a.

6 Pools von Meningeompatienten
6 Pools von Gliompatienten
2 Pools von gesunden Probanden

Detektion von Autoantikörpern
in den Serumpools



Erstellen eines Subarrays mit
allen 1827 positiven Klonen

Erstellen eines Seroreaktivitätsprofils bei Patienten

Screening des Subarrays mit Patientenserum:

57 Gliompatienten
53 Meningeompatienten
60 gesunde Kontrollen

Detektion von Autoantikörpern
in Einzelseren

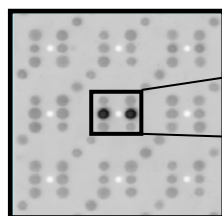


Klassifizierung von Patientenserum anhand von Seroreaktivitätsprofilen

Automatische
Bildauswertung

Quantifizierung und Normalisierung
der Seroreaktivität

Klassifikation



1	1	1	0	30
0	34	1	35	1
1	85	0	88	0
1	32	1	28	1
30	1	2	1	2

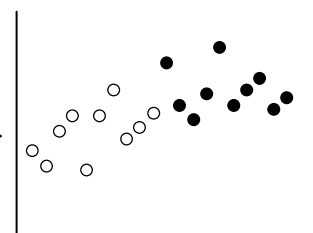


Abb. 9: Vorgehensweise zur Identifizierung weiterer Meningeom-assoziiierter Antigene

3.1.4.1 Klassifikation von Meningeomseren

Zunächst sollten die Seren der 53 untersuchten Meningeompatienten von den Seren der 60 untersuchten Kontrollprobanden ohne bekannte Erkrankung statistisch differenziert werden. Dies geschah mithilfe der erstellten Seroreaktivitätsprofile gegenüber den 1417 immunogenen Klonen. Diese Klassifikation Meningeome versus Gesunde erreichte eine Spezifität von 95,6 %, eine Sensitivität von 91,8 % und eine Genauigkeit von 93,8 % (siehe Tab. 14). Das bedeutet, dass von den 60 Seren der gesunden Kontrollen 95,6 % richtig als Normalseren klassifiziert wurden. Umgekehrt wurden von den 53 untersuchten Meningeompatienten 91,8 % richtig als Meningeompatienten erkannt. Daraus ergibt sich eine diagnostische Genauigkeit von 93,8 % an richtig klassifizierten Seren. Da statistische Modelle in ihrer Aussagekraft immer mehr oder weniger geringen Schwankungen unterliegen, wurden die Klassifikationsberechnungen zur Differenzierung von Meningeomen und gesunden Kontrollen 100-mal wiederholt. Die oben angegebenen Werte sind jeweils die Mittelwerte aus diesen 100 Klassifikationsberechnungen. Das sogenannte 95 %-Konfidenzintervall wurde als Maß für die Stabilität des statistischen Modells herangezogen. Dieses beschreibt jeweils das Intervall von Sensitivität, Spezifität und Genauigkeit, in dem sich 95 der 100 durchgeführten Klassifikationsberechnungen bewegen. Im Beispiel der Sensitivität der Trennung von Meningeomseren und Kontrollseren liegt dieses Intervall bei 91,47 - 92,19 %, d. h., dass 95 der 100 durchgeführten Klassifikationsberechnungen Werte für die Sensitivität zwischen 91,47 % und 92,19 % erreichten. Dieses Intervall beträgt in diesem Beispiel, wie auch bei den Werten für Spezifität und Genauigkeit, weniger als einen Prozentpunkt, was die Stabilität des verwendeten Modells eindeutig belegt.

Als weitere Kontrolle wurde die gesamte Klassifikationsberechnung nochmals durchgeführt, allerdings wurden hierfür die 113 getesteten Seren zufällig in eine Gruppe von 53 „Meningeompatienten“ und eine Gruppe von 60 „gesunden Kontrollen“ eingeteilt. Diese zufällige Einteilung wurde insgesamt 100-mal durchgeführt und für jede Einteilung wurden Sensitivität, Spezifität und Genauigkeit ermittelt. Diese zufällige Einteilung resultierte in einer Spezifität von 52,9 %, einer Sensitivität von 44,3 % und einer Genauigkeit von 48,8 %. Das bedeutet, dass in dieser Kontrolle ungefähr 49 von 100 Seren richtig klassifiziert werden. Da dieser Wert auch mit zufälligem Raten erreicht werden kann, bestätigt dies die reale Unterscheidbarkeit von Meningeomen und Gesunden mit dem verwendeten statistischen Modell.

Tab. 14: Klassifikation von Meningeomen mittels Proteinmakroarray

Klassifikation	Spezifität [%]	Sensitivität [%]	Genauigkeit [%]
Meningeome vs. Gesunde	95,6 [95,17-96,07]	91,8 [91,47-92,19]	93,8 [93,52-94,16]
Kontrolle	52,9 [51,61-54,19]	44,3 [42,84-45,65]	48,8 [47,67-50,01]
Meningeome vs. Gliome	85,0 [84,53-85,36]	91,4 [90,99-91,73]	88,0 [87,74-88,33]
Kontrolle	51,5 [50,35-52,74]	45,7 [44,30-47,10]	48,7 [47,60-49,85]

In eckigen Klammern ist jeweils das 95 % Konfidenzintervall angegeben. Die Werte für die jeweilige Kontrolle beziehen sich auf die stratifizierte Permutation, siehe Material und Methoden, Kapitel 2.5.5.

Nachdem die Differenzierung von Meningeomen und Gesunden anhand der Seroreaktivitätsmuster sehr gute Ergebnisse lieferte, wurde untersucht, ob sich die Seren der Meningeompatienten auch von Seren anderer Patienten mit Tumoren desselben Organs unterscheiden lassen. Hierfür wurden die Seroreaktivitätsmuster der 53 untersuchten Meningeompatienten mit denen von 57 Gliompatienten verglichen und analog zu der Differenzierung von Meningeomen und Gesunden wurde ein statistisches Modell aufgestellt.

Die Klassifizierung der Seren von Meningeompatienten versus Gliompatienten erreichte eine Spezifität von 85,0 %, eine Sensitivität von 91,4 % und eine Genauigkeit von 88,0 % (Tab. 14). Das bedeutet, dass 85 % der Gliompatienten korrekt als solche klassifiziert wurden, sowie 91,4 % der Meningeompatienten richtig erkannt wurden. Wie bereits bei der Klassifizierung von Meningeomen versus Gesunde lagen auch hier die 95 %-Konfidenzintervalle im Bereich eines Prozentpunktes, womit auch eine hohe Stabilität dieses Modells nachgewiesen werden konnte. In der Kontrollberechnung, basierend auf der zufälligen Einteilung der Seren in die Gruppen der Meningeom- und Gliompatienten, wurde eine Spezifität von 51,5 %, eine Sensitivität von 45,7 % und eine Genauigkeit von 48,7 % erreicht, was dem Zufall entspricht.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sich der verwendete Proteinmakroarray mit 1827 immunogenen Klonen sehr gut für eine Differenzierung der Meningeomseren sowohl von den Seren gesunder Kontrollen, als auch von den Seren von Gliompatienten eignet. Für beide Klassifikationen wurden sehr hohe Werte für Sensitivität und Spezifität erreicht.

3.1.4.2 Frequenz der Seroreaktivität in Meningeom- und Normalseren gegenüber den Antigenen

Nach der erfolgreichen Klassifikation von Meningeomseren aufgrund ihrer Seroreaktivität gegenüber den 1827 immunogenen Klonen sollte im Folgenden die Häufigkeit der positiven Autoantikörperreaktion für alle Klone in den Seren von Meningeompatienten sowie in den Seren der gesunden Kontrollgruppe ermittelt werden. Hierzu wurde ein Schwellenwert für die Intensität der Seroreaktivität gewählt, oberhalb dessen von einer positiven Seroreaktivität gesprochen werden kann (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.5.5). Auch für diese Betrachtung wurden die 410 Klone, welche aus Qualitätsgründen nach der Normalisierung ausgeschlossen wurden, nicht beachtet. Anschließend wurde für jeden der 1417 verbleibenden Klone jeweils die Frequenz des Vorhandenseins von Autoantikörpern in den Seren von Meningeompatienten und in den Seren von Gesunden ermittelt. Des Weiteren wurden im Folgenden *in-frame* Klone und *out-of-frame* Klone unterschieden. Unter *in-frame* Klonen wird in diesem Zusammenhang verstanden, dass die einklonierte humane cDNA-Sequenz im gleichen Leseraster abgelesen wird, wie dies in humanen Zellen der Fall ist. Das resultierende Protein entspricht also dem Protein aus humanen Zellen. Bei den *out-of-frame* Klonen hingegen befindet sich die einklonierte cDNA-Sequenz nicht im gleichen Leseraster wie in den humanen Zellen. Daher entspricht das von dem Klon gebildete Protein nicht dem Protein, das in humanen Zellen produziert wird. In einem solchen Fall wird oft von einem sogenannten Mimotop gesprochen, d. h. dass das von dem Klon produzierte „falsche“ Protein in seiner Aminosäuresequenz oder räumlichen Struktur einem anderen, nicht sequenzverwandten Protein ähnelt. Daher kann es u. a. zu einer Kreuzreaktion der Autoantikörper, welche gegen das andere Protein gerichtet sind, mit dem von dem *out-of-frame* Klon produzierten „falschen“ Protein kommen. Für die rein statistische Klassifikationsbetrachtung ist es irrelevant, ob ein Klon ein *in-frame* oder ein *out-of-frame* Klon ist, für die biologische Interpretation der Autoantikörperantwort bei Patienten sind jedoch nur die *in-frame* Klone von Bedeutung. Unter den 1417 Klonen befinden sich insgesamt 391 *in-frame* Klone und 1026 *out-of-frame* Klone.

Insgesamt konnte bei 105 Klonen keine Seroreaktivität in Meningeomseren und bei 176 Klonen keine Seroreaktivität in Normalseren festgestellt werden (siehe Tab. 15). Betrachtet man lediglich die 391 *in-frame* Klone, so konnten gegen insgesamt 40 Klone keine Autoantikörper in den Seren der Meningeompatienten sowie gegen 62 Klone keine

Autoantikörperantwort in den Seren der gesunden Kontrollgruppe festgestellt werden. Gegen insgesamt 37 Klone (davon 6 *in-frame*) konnten Antikörper in über 60 % der Seren der Meningeompatienten nachgewiesen werden. Eine Seroreaktivität von über 60 % in Normalseren konnte bei 43 Klonen (davon 7 *in-frame*) gezeigt werden.

Tab. 15: Häufigkeit von Autoantikörperreaktionen in Meningeompatienten im Proteinmakroarray

Frequenz	Meningeome		Gesunde		Meningeome*	
	Anzahl Klone (Gesamt)	Anzahl Klone (<i>in-frame</i>)	Anzahl Klone (Gesamt)	Anzahl Klone (<i>in-frame</i>)	Anzahl Klone (Gesamt)	Anzahl Klone (<i>in-frame</i>)
0 %	105	40	176	62	-	-
0 – 10 %	578	171	552	169	141	70
10 – 20 %	321	85	305	78	67	28
20 – 30 %	184	43	163	36	35	12
30 – 40 %	119	30	93	22	15	6
40 – 50 %	49	14	55	8	3	2
50 – 60 %	24	2	30	9	1	0
60 – 70 %	20	3	27	5	2	0
70 – 80 %	11	2	11	2	0	0
80 – 90 %	5	1	4	0	0	0
90 – 100 %	1	0	1	0	0	0

* Hier sind nur die Klone berücksichtigt, deren Frequenz in Meningeomen mindestens doppelt so hoch ist wie in Gesunden. **Fett** = näher zu betrachtende *in-frame* Klone, siehe Tabelle 16

Eine Analyse der Identität dieser Klone ergab einen großen Überlapp zwischen den Klonen, die häufig in Meningeomseren positiv waren, und den Klonen, die häufig in den Seren der Gesunden detektiert wurden (Daten nicht gezeigt). Diese Klone sind daher für eine Unterscheidung von Meningeomseren und Normalseren weniger geeignet. Daher wurden im Weiteren nur die Klone betrachtet, deren Frequenz in Meningeomseren mindestens doppelt so hoch war wie in Normalseren, d. h. gegen die Autoantikörper in mindestens doppelt so vielen, getesteten Meningeomseren festgestellt wurden wie in den getesteten Normalseren. Dies war bei insgesamt 264 Klonen, darunter 118 *in-frame* Klonen, der Fall. Wie aus Tabelle 15 zu erkennen ist, wiesen aus dieser Gruppe von Klonen nur noch zwei Klone eine Frequenz in Meningeomen von mehr als 60 % auf, darunter kein *in-frame* Klon. Da für eine biologische Interpretation der Autoantikörperantwort in Tumorpatienten gerade die *in-frame* Klone die wichtigsten sind und auch in den Arbeiten mithilfe des serologischen Spotassays (siehe Kapitel 3.1.1.1) wirklich informative Klone oft eine Frequenz in Meningeomen von nur etwa 20 % aufwiesen, werden im Weiteren die *in-frame* Klone näher betrachtet, die 1) eine Häufigkeit der Autoantikörperantwort in Meningeomen von über 20 % haben und 2) gegen die Autoantikörper in mindestens doppelt so vielen, getesteten Meningeomseren festgestellt wurden wie in den getesteten Normalseren (Tab. 15, letzte Spalte). Diese Bedingungen erfüllten insgesamt 20 Klone, von denen zwölf Klone eine positive Seroreaktivität in 20 - 30 %, sechs Klone eine positive Seroreaktivität in 30 - 40 % und zwei Klone eine positive

Seroreaktivität in 40 - 50 % der Meningeomseren zeigten. Die Identität der 20 Klone ist in Tabelle 16 angegeben. Der Klon mit der höchsten Frequenz in Meningeomen repräsentiert das Gen „*nuclear prelamin A recognition factor-like*“ (NARFL) mit einer Frequenz in Meningeomseren von 49 % und einer Frequenz in Normalseren von 23 %.

Tab. 16: Frequenz häufig detektierter Autoantikörper in Meningeomen

Klon ID	Ensemble ID	Genname	Frequenz Meningeome [%]	Frequenz Gesunde [%]	als Antigen bekannt*
L21568	ENSG00000103245	NARFL	49,06	23,33	
I24542	ENSG00000159239	LOC388963	43,40	21,67	
M24570	ENSG00000004534	RBM6	39,62	16,67	+
I14577	ENSG00000152795	HNRPDL	37,74	18,33	
M15565	ENSG00000166313	APBB1	32,08	10,00	
N17549	ENSG00000087152	ATXN7L3	30,19	8,33	
N11556	ENSG00000179091	CYC1	30,19	13,33	
M22541	ENSG00000171700	RGS19	30,19	15,00	
J17573	ENSG00000168439	STIP1	26,42	10,00	+
P08562	ENSG00000197907		26,42	11,67	
O24584	ENSG00000089009	RPL6	26,42	11,67	+
N07524	ENSG00000197907		24,53	6,67	
I19558	ENSG00000197907		24,53	10,00	
N12581	ENSG00000152795	HNRPDL	24,53	10,00	
F21506	ENSG00000143164	IQWD1	22,64	3,33	+
O19578	ENSG00000100412	ACO2	22,64	5,00	
G20576	ENSG00000129951	PRG2	22,64	5,08	
H05579	ENSG00000166313	APBB1	21,15	8,33	
F10584	ENSG00000198816	ZNF358	20,75	5,00	
C02559	ENSG00000077279	DCX	20,75	6,67	

* Gen als Antigen in der „*Cancer Immunome Database*“ niedergelegt

Weitere repräsentierte Gene sind „*RNA binding motif protein 6*“ (RBM6), „*stress-induced-phosphoprotein 1*“ (STIP1), „*60S ribosomal protein L6*“ (RPL6) und „*IQ motif and WD repeats 1*“ (IQWD1), welche bereits als immunogen in verschiedenen Krebsformen beschrieben und in der „*Cancer Immunome Database*“ als solche niedergelegt sind (<http://ludwig-sun5.unil.ch/CancerImmunomeDB/>, CIDB). Interessanterweise wurde das Antigen IQWD1 bereits mithilfe des SEREX-Verfahrens als immunogenes Antigen in Meningeomen identifiziert [Comtesse et al., 2005].

3.1.4.3 Klassifikations-relevante Antigene in Meningeomen

Nicht jeder der untersuchten 1827 immunogenen Klone hat den gleichen Anteil an dem statistischen Modell, welches für die Differenzierung der Seren der Meningeompatienten von den Seren der Gesunden bzw. der Gliompatienten erstellt wurde. Als Maß für diesen Informationsgehalt wurde hier der AUC-Wert („*Area under the Receiver-Operator Characteristics Curve*“) dieser Klone herangezogen (Details zu der Berechnung finden sich

in Material und Methoden, Kapitel 2.5.5). Bei einer Differenzierung von Meningeomen und Gesunden bedeutet ein AUC-Wert eines Klon von 1, dass die Spotintensitäten des Klon in den Meningeomseren alle unter einem bestimmten Schwellenwert liegen, während die Spotintensitäten des Klon in den Seren der gesunden Probanden alle über diesem Wert liegen. Bei einem AUC-Wert von 0 liegen die Werte aller Spotintensitäten der Meningeome über einem bestimmten Schwellenwert, während die Spotintensitäten in den gesunden Seren darunter liegen. In beiden Fällen ist eine Differenzierung von Meningeomen und gesunden Kontrollen unter Verwendung dieses einen Klon mit einer Sensitivität, Spezifität und Genauigkeit von jeweils 100 % möglich. Daher wurden im Folgenden Antigene als informativ für die Differenzierung angesehen, wenn diese AUC-Werte von 0 - 0,3 bzw. 0,7 - 1 aufwiesen. Eine Übersicht über die AUC-Werte aller Klone liefert Tabelle 17.

Tab. 17: Überblick über die Verteilung der AUC-Werte für die Klassifikation von Meningeomen

AUC Werte	Meningeome vs. Gesunde		Meningeome vs. Gliome	
	Anzahl Klone (Gesamt)	Anzahl Klone (<i>in-frame</i>)	Anzahl Klone (Gesamt)	Anzahl Klone (<i>in-frame</i>)
0.0-0.1	0	0	0	0
0.1-0.2	1	0	0	0
0.2-0.3	41	21	16	4
0.3-0.4	285	92	238	70
0.4-0.5	516	149	541	147
0.5-0.6	423	107	444	125
0.6-0.7	133	20	161	39
0.7-0.8	18	2	17	6
0.8-0.9	0	0	0	0

Fett = Klassifikations-relevante Antigene, siehe Tabelle 18

Die Mehrheit der Klone (ca. 95 %) wiesen AUC-Werte zwischen 0,3 und 0,7 auf, welche als nicht informativ für eine Trennung gewertet wurden. Insgesamt wurden 60 Klone, darunter 23 *in-frame* Klone, für die Trennung von Meningeomen und Gesunden, und 33 Klone, darunter 10 *in-frame* Klone, für die Trennung von Meningeomen und Gliomen als informativ angesehen. Die Identität dieser informativen, *in-frame* Klone ist in Tabelle 18 aufgeführt.

Tab.18: Klassifikations-relevante Antigene in Meningeomen:

Klon ID	Ensemble ID	Genname	AUC Meningeome vs. Gesunde	AUC Meningeome vs. Gliome	als Antigen bekannt*
J17570	ENSG00000074800	ENO1	0,202	0,296	
J15577	ENSG00000026025	VIM	0,226	0,494	+
I19578	ENSG00000111653	ING4	0,242	0,372	
F16518	ENSG00000183049	CAMK1D	0,248	0,412	
F21600	ENSG00000168159	RNF187	0,250	0,412	
F21577	ENSG00000166313	APBB1	0,258	0,338	
O14538	ENSG00000149925	ALDOA	0,259	0,329	+
H07595	ENSG00000064692	SNCAIP	0,265	0,417	
C13512	ENSG00000067225	PKM2	0,266	0,394	
K23602	ENSG00000131899	LLGL1	0,266	0,343	
J19550	ENSG00000101361	NOL5A	0,276	0,366	
M15565	ENSG00000166313	APBB1	0,276	0,415	
I21518	ENSG00000124562	SNRPC	0,277	0,396	
F21506	ENSG00000143164	IQWD1	0,284	0,345	+
D18552	ENSG00000153317	DDEF1	0,285	0,477	
G22556	ENSG00000116148	CCNL2	0,287	0,334	+
E21571	ENSG00000136319	TTC5	0,292	0,374	
G20580	ENSG00000105220	GPI	0,294	0,520	
H18530	ENSG00000091140	DLD	0,295	0,528	
J23510	ENSG00000114841	DNAH1	0,298	0,362	
G18583	ENSG00000167775	CD320	0,298	0,337	+
H05579	ENSG00000166313	APBB1	0,315	0,258	
J17573	ENSG00000168439	STIP1	0,332	0,249	+
I18507	ENSG00000068400	GRIPAP1	0,345	0,288	
B17512	ENSG00000026025	VIM	0,396	0,707	+
G11585	ENSG00000186792	HYAL3	0,539	0,726	
F07551	ENSG00000198242	RPL23A	0,565	0,715	
P20598	ENSG00000110700	RPS13	0,597	0,710	+
C14513	ENSG00000162244	RPL29	0,662	0,743	
B12601	ENSG00000154556	SORBS2	0,666	0,798	
G09554	ENSG00000137497	NUMA1	0,714	0,575	
C11538	ENSG00000173812	EIF1	0,728	0,582	

* Gen als Antigen in der „Cancer Immunome Database“ niedergelegt, **Fett** = als informativ angesehene AUC-Werte

Den höchsten Informationsgehalt für die Trennung von Meningeomen und Gesunden wies mit 0,202 der Klon, der das Gen „*enolase 1*“ (ENO1) repräsentiert, auf. Dieser Klon wies mit 0,296 ebenfalls einen guten AUC-Wert für die Klassifikation Meningeome versus Gliome auf. Den besten AUC-Wert für die Trennung von Meningeomen und Gliomen wies mit 0,792 der Klon, der die Sequenz des Gens „*sorbin and SH3 domain containing 2*“ (SORBS2) trägt, auf. Insgesamt acht Klone repräsentieren Gene, die bereits in verschiedenen Krebserkrankungen als immunogen beschrieben worden sind, u. a. die Gene „*vimentin*“ (VIM), „*IQ motif and WD repeats 1*“ (IQWD1), „*cyclin-L2*“ (CCNL2), oder „*8D6 antigen*“ (CD320).

Die Intensitätswerte der einzelnen Seren gegenüber den Klonen ENO1 und SORBS2 sind in Abbildung 10 veranschaulicht. Am Beispiel des Klons ENO1 (Abb. 11 A) lässt sich deutlich

erkennen, dass die Intensitätswerte der Meningeomseren (gefüllte Kreise) im Mittel über den Intensitätswerten der Normalseren (leere Kreise) liegen, d. h. dass im Mittel eine stärkere Autoantikörperantwort in Meningeompatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen vorliegt.

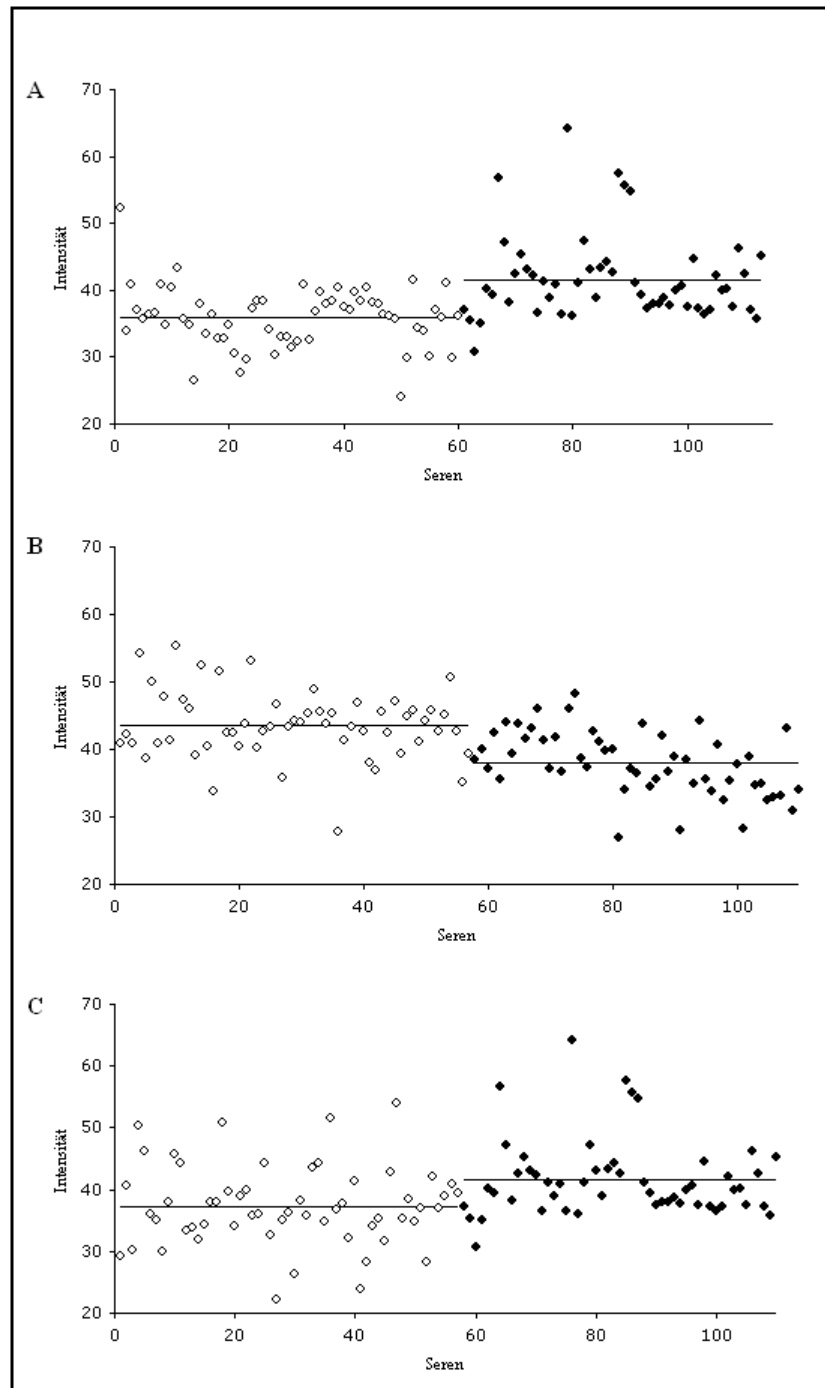


Abb. 10: Seroreaktivität gegenüber den Klonen ENO1 und SORBS2. **A:** Seroreaktivität gegenüber dem Klon ENO1 in gesunden Kontrollen (leere Kreise) und Meningeomen (gefüllte Kreise). **B:** Seroreaktivität gegenüber dem Klon SORBS2 in gesunden Kontrollen (leere Kreise) und Meningeomen (gefüllte Kreise). **C:** Seroreaktivität gegenüber dem Klon ENO1 in Gliomen (leere Kreise) und Meningeomen (gefüllte Kreise).

Bei dem Klon SORBS2 hingegen liegt im Mittel eine geringere Autoantikörperantwort in Meningeompatienten (gefüllte Kreise) im Vergleich zu den Gliompatienten (leere Kreise) vor. Hierbei zeigt sich auch, dass sowohl das Vorhandensein von Autoantikörpern in Meningeomseren, als auch deren Fehlen für eine statistische Differenzierung von Meningeomseren hilfreich ist.

Zusammenfassend konnte zum einen nachgewiesen werden, dass Seroreaktivitätsmuster sehr gut zur Differenzierung von Meningeomseren und Kontrollen geeignet sind. Zum anderen zeigte die Fülle an Meningeom-assoziierten Antigenen, welche in diesem Kapitel identifiziert wurden, dass es wohl noch eine Vielzahl unentdeckter Meningeom-assoziiierter Antigene gibt, die möglicherweise die Spezifität und Sensitivität einer Klassifikation von Meningeomen basierend auf Seroreaktivitätsmustern weiter steigern könnten. Des Weiteren wurden viele Antigene, welche bereits in anderen Krebspatienten als immunogen beschrieben worden sind, nun auch im Zusammenhang mit Meningeomen als immunogen gezeigt. Die gesamten Daten zur Klassifizierung der Meningeome mittels des Proteinmakroarrays erhielten Eingang in ein zur Veröffentlichung fertiggestelltes Manuskript.

3.2 Gliome

Ein weiteres zentrales Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse der Autoimmunantwort in Patienten mit Gliomen. Hierbei sollten u. a. folgende Fragen geklärt werden: Gibt es eine spezifische Autoimmunantwort in Gliompatienten, die sich in ihrem Seroreaktivitätsmuster von der Autoimmunantwort in Patienten mit anderen Erkrankungen des zentralen Nervensystems bzw. von der Autoimmunantwort, wie sie auch in gesunden Personen zu detektieren ist, unterscheidet? Lassen sich die Antigene, gegen die diese Immunantwort gerichtet ist, mit der Biologie der Gliome in Verbindung bringen? Lassen sich Gliompatienten anhand ihrer Seroreaktivität mit ausreichend hoher Spezifität und Sensitivität von anderen Kontrollen differenzieren, sodass möglicherweise eine klinische Anwendung eines solchen Tests in Frage kommen könnte? Können noch weitere Antigene außer den bereits bekannten Gliom-assoziierten Antigenen in den Seren von Gliompatienten detektiert werden und können diese neuen Gliom-assoziierten Antigene die Klassifizierung der Gliome gegenüber anderen Kontrollen weiter verbessern?

Nachdem die generelle Machbarkeit einer Differenzierung von Tumorseren aufgrund von Seroreaktivitätsmustern bei den benignen Meningeomen gezeigt werden konnte, wurden die etablierten Verfahren im Anschluss auch bei den malignen Gliomen angewandt. Da die experimentelle Durchführung sowie die statistische Auswertung jeweils analog zu den entsprechenden Untersuchungen an den Meningeomen durchgeführt wurden, wird darauf im Folgenden nur kurz eingegangen. Für Details hierzu sei auf die entsprechenden Kapitel bei den Meningeomen verwiesen.

3.2.1 Seroreaktivität in Gliomen mittels serologischem Spotassay

Die Arbeitsgruppen Struss et al. und Fischer et al. haben bereits in Vorarbeiten Gliom-assoziierte Antigene mithilfe des SEREX-Verfahrens identifiziert [Michel et al., 2000; Struss et al., 2001; Fischer et al., 2001; unveröffentlichte Daten]. Durch Screening jeweils einer Expressionsbank hergestellt aus einer Glioblastom-Zelllinie, eines pilozytischen Astrozytoms und eines Glioblastoms konnten zwölf Gliom-assoziierte Antigene identifiziert werden. Da die Analyse eines Seroreaktivitätsmusters gegen nur zwölf Antigene statistisch keine verlässlichen Ergebnisse liefern würde, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Panel aus 35 Antigenen zusammengestellt, welches neben diesen zwölf Gliom-assoziierten Antigenen noch

23 weitere Tumor-assoziierte Antigene, welche im Rahmen der Arbeit von Comtesse et al. bei Meningeomen identifiziert wurden [Comtesse et al., 2005], enthielt. Zur Bestimmung der Häufigkeit einer Immunantwort gegen diese Antigene wurde ein serologischer Spotassay mit einer großen Zahl an Tumorseren und Kontrollseren durchgeführt. Insgesamt wurden mit diesem Test 325 Seren von Patienten untersucht, darunter 88 Seren von Gliompatienten, 155 Seren von Patienten mit anderen tumorösen und nicht-tumorösen Erkrankungen des zentralen Nervensystems sowie 82 Seren von gesunden Kontrollprobanden. Der Altersdurchschnitt der Gliompatienten war 45,7 Jahre, der Altersdurchschnitt aller Kontrollgruppen lag bei 48,6 Jahren. Der Unterschied war statistisch nicht signifikant (Wilcoxon-Mann-Whitney Test). Auch der Unterschied in der Geschlechterverteilung beider Gruppen war statistisch nicht signifikant (Fisher's Exact Test).

3.2.1.1 Frequenz der Seroreaktivität

Zunächst wurde die Zahl der positiven Antikörperantworten in den Seren der betrachteten Gruppen ermittelt. Tabelle 19 gibt eine genaue Übersicht über die Anzahl der getesteten Seren in den einzelnen Gruppen sowie über die mittlere Seroreaktivität in den einzelnen Gruppen. Das Serum eines Gliompatienten zeigt im Durchschnitt eine Antikörperreaktion gegen 4,9 Antigene, während das Serum eines gesunden Kontrollprobanden nur eine Antikörperreaktion gegen 3,3 Antigene aufwies. Auch die Frequenz der Antikörperantworten in den Seren von Patienten mit tumorösen und nicht-tumorösen Erkrankungen des ZNS lag im Schnitt bei 3,3 Antigenen pro Serum. In beiden Fällen ist der Unterschied zu der Frequenz der Antikörperantwort in Gliompatienten statistisch signifikant ($p\text{-Wert} < 10^{-10}$). Die Analyse der Frequenz der Antikörperantwort innerhalb der Gruppe der Gliompatienten ergab einen Abfall der durchschnittlichen Reaktivität pro Serum mit steigendem Tumorgrad. Während die Gruppe der WHO II Gliome im Schnitt gegen 5,37 Antigene pro Serum Antikörper aufwies, lag dieser Wert bei den WHO III Gliomen bei 5,17 und bei Glioblastomen nur noch bei 4,63. Dieser Unterschied zeigt allerdings nur eine Tendenz an und war statistisch nicht signifikant. Ein signifikanter Abfall der Seroreaktivität mit steigendem WHO-Grad wurde allerdings bereits von Comtesse et al. bei Meningeomen beschrieben [Comtesse et al., 2005]. Betrachtet man die einzelnen Kontrollgruppen etwas genauer fällt auf, dass die Seren von Meningeompatienten die gleiche mittlere Reaktivität zeigen wie die Seren der Gliompatienten. In beiden Patientengruppen werden im Schnitt Autoantikörper gegen 4,9 Antigene pro Serum detektiert. Die durchschnittliche Reaktivität aller anderen getesteten

Kontrollgruppen lag z. T. weit unterhalb dieses Wertes. Dies deutet auf eine starke Immunreaktion sowohl gegen Gliome als auch gegen Meningeome hin, während andere Erkrankungen keine derart starken Autoimmunreaktionen auslösen.

Tab. 19: Mittlere Seroreaktivität der im serologischen Spotassay untersuchten Patientengruppen

			Anzahl Seren	Durchschnittliche Reaktivität	
Gesamt			325	3,8	
Gesund Gliome	gesamt		82	3,3	
		WHO II	88	4,9	
		WHO III	19	5,4	
		WHO IV	12	5,2	
			57	4,6	
	andere Erkrankungen		155	3,3	
		<i>Tumor</i>		95	3,7
			Meningeom	35	4,9
			Adenom	20	3,0
			Neurinom	20	3,0
Metastase	20		2,8		
<i>nicht Tumor</i>		60	3,1		
	Multiple Sklerose	20	3,5		
	CIDP*	20	2,6		
	Kopfschmerzen	20	3,3		

* CIDP: chronisch inflammatorische, demyelinisierende Polyradikuloneuropathie

Anschließend wurde die Frequenz der positiven Seren für jedes der 35 Antigene für die verschiedenen Patientengruppen ermittelt. Diese sind in Tabelle 20 aufgeführt. Es wurden acht Antigene ermittelt, die nur mit Seren von Gliompatienten, aber nicht mit Seren von gesunden Kontrollprobanden reaktiv waren. Zu diesen Antigenen zählen „*PHD finger protein 3*“, (PHF3), „*PHD finger protein 20*“ (PHF20, auch unter dem Namen „*glioma expressed antigen 2*“ (GLEA2) bekannt), „*translocated promoter region*“ (TPR), „*SPECC1-like*“ (SPECC1L), „*golgi autoantigen, golgin subfamily a 1*“ (GOLGA1), „*natural killer-tumor recognition sequence*“ (NKTR), „*thioredoxin domain containing 16*“ (TXNDC16) und „*nitrilase family member 2*“ (NIT2). Die höchste Frequenz zeigte hierbei das Antigen GLEA2, welches in 14,77 % der Gliomseren detektiert wurde. Bis auf SPECC1L zeigten aber alle anderen sieben Antigene eine Reaktivität mit weiteren Seren aus den Kontrollgruppen. Generell liegt aber bei den meisten Antigenen eine höhere Reaktivität mit Gliomseren als mit Kontrollseren vor. Keine Autoantikörper in Gliomseren konnten für insgesamt fünf der 35 Antigene festgestellt werden.

Tab. 20: Seroreaktivität von Gliompatienten und Kontrollen gegenüber Gliom-assoziierten Antigenen [in %]

Antigene	Gesunde	Gliome				Andere Tumore	Meningeome	Neurolog. Erkrankungen
		alle	WHO II	WHO III	WHO IV			
ACTN4	3,7	9,1	26,3	16,7	1,8	6,3	14,3	1,7
ING4	2,4	14,8	21,1	8,3	14,0	1,1	0,0	1,7
RTN4	11,0	42,0	47,4	75,0	33,3	12,6	17,1	13,3
CLIP2	17,1	29,5	42,1	41,7	22,8	14,7	14,3	33,3
HCLS1	6,1	8,0	10,5	0,0	8,8	6,3	5,7	10,0
ZRSR1	65,9	59,1	63,2	58,3	57,9	40,0	54,3	45,0
ZNF232	1,2	8,0	10,5	8,3	7,0	5,3	11,4	5,0
SC65	4,9	17,0	15,8	16,7	17,5	2,1	0,0	3,3
PHF3*	0,0	4,5	10,5	0,0	3,5	2,1	5,7	1,7
PHF20 (GLEA2)*	0,0	14,8	10,5	8,3	17,5	0,0	0,0	1,7
TPR*	0,0	2,3	0,0	0,0	3,5	5,3	2,9	11,7
SPECC1L*	0,0	9,1	5,3	16,7	8,8	0,0	0,0	0,0
GOLGA1*	0,0	5,7	5,3	0,0	7,0	12,6	17,1	10,0
NKTR*	0,0	1,1	0,0	0,0	1,8	11,6	22,9	5,0
SOX2	1,2	2,3	0,0	0,0	3,5	9,5	17,1	10,0
TXNDC16*	0,0	4,5	0,0	8,3	5,3	5,3	8,6	1,7
TBC1D4	7,3	17,0	15,8	8,3	19,3	18,9	25,7	6,7
USP37	1,2	4,5	0,0	0,0	7,0	7,4	11,4	3,3
C6orf153	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	6,3	8,6	6,7
MGEA11	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
YBX1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,3	11,4	1,7
SC65	11,0	8,0	15,8	8,3	5,3	10,5	11,4	5,0
PIBF1	1,2	2,3	0,0	8,3	1,8	15,8	25,7	20,0
NIT2*	0,0	3,4	0,0	0,0	5,3	8,4	8,6	5,0
ARHGAP18	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,1	2,9	3,3
MGEA5s	8,5	6,8	15,8	16,7	1,8	8,4	17,1	6,7
TNKS	3,7	5,7	0,0	25,0	3,5	8,4	14,3	3,3
TMEM57	3,7	1,1	0,0	8,3	0,0	2,1	2,9	0,0
MAP4K4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,3	8,6	0,0
PAFAH1B1	1,2	1,1	0,0	0,0	1,8	4,2	11,4	3,3
WDR85	20,7	56,8	47,4	16,7	68,4	14,7	11,4	3,3
SART1	13,4	64,8	47,4	83,3	66,7	34,7	54,3	23,3
RBPJ	37,8	19,3	21,1	25,0	17,5	4,2	5,7	8,3
TNKS2	46,3	40,9	63,2	41,7	33,3	16,8	11,4	5,0
BRAP	61,0	22,7	42,1	16,7	17,5	56,8	51,4	50,0
ACTN4	3,7	9,1	26,3	16,7	1,8	6,3	14,3	1,7

* Gliom-assoziierte Antigene, gegen die keine Autoantikörper in den Seren der gesunden Kontrollen detektiert wurden.

Die Ergebnisse zeigen, dass es eine häufige Immunantwort in Gliompatienten gibt und dass sich diese durchaus von der Immunantwort gegen andere Erkrankungen des zentralen Nervensystems unterscheidet.

3.2.1.2 Klassifikation von Gliomseren

Hauptziel dieser Untersuchung war die Differenzierung der Seren von Gliompatienten von den Seren gesunder Kontrollprobanden anhand ihrer Seroreaktivitätsprofile. Des Weiteren sollte auch eine Differenzierung der Seren von Gliompatienten von den Seren von anderen Patientengruppen mit Tumor- und Nicht-Tumor-Erkrankungen des zentralen Nervensystems anhand von Seroreaktivitätsmustern versucht werden. Hierfür wurde, wie schon für die Klassifikation der Meningeomseren in Kapitel 3.1.1.2, der eigens zur Analyse von Seroreaktivitätsmustern entwickelte Webservice „SePACS“ verwendet [Keller et al., 2007].

Nach der Bestimmung der Seroreaktivitätsmuster für die 35 untersuchten Antigene in den

einzelnen Patienten- und Kontrollgruppen wurden mithilfe von „SePACS“ folgende Klassifikationsaufgaben definiert und berechnet: Differenzierung der Seren von Gliompatienten von 1) den Seren aller anderen Kontrollgruppen, d. h. andere tumoröse und nicht-tumoröse Erkrankungen des ZNS, sowie die Gruppe der gesunden Kontrollprobanden; 2) den Seren der Gruppe der gesunden Kontrollprobanden; 3) den Seren der Patienten mit anderen, nicht-tumorösen, neurologischen Erkrankungen (Multiple Sklerose, CIDP, Kopfschmerzen); 4) den Seren der Patienten mit anderen, intrakraniellen Tumoren (Meningeome, Akustikusneurinome, Hypophysenadenome, Metastasen von nicht ZNS-Tumoren); 5) den Seren von Meningeompatienten. Die Ergebnisse der Klassifikationen sind in Tabelle 21 aufgeführt.

Tab. 21 Klassifikation von Gliomen mittels serologischem Spotassay (p-Werte für alle Klassifikationen $<10^{-10}$)

Klassifikation	Spezifität [%]	Sensitivität [%]	Genauigkeit [%]
Gliome vs. Alle	92,4	70,1	86,2
Gliome vs. Gesund	87,8	85,2	86,5
Gliome vs. neurologische Erkrankungen	81,7	93,2	87,8
Gliome vs. andere intrakranielle Tumore	89,5	86,4	88,0
Gliome vs. Meningeome	96,6	80,0	91,9

Bei der Trennung der Seren von Gliompatienten von den Seren aller anderen Kontrollgruppen wurde eine Spezifität von 92,4 %, eine Sensitivität von 70,1 % und eine Genauigkeit von 86,2 % erreicht. Das bedeutet, dass 92,4 % der Kontrollseren sowie 70,1 % der Gliomseren korrekt als solche erkannt wurden. Die Differenzierung der Seren von Gliompatienten von den Seren der gesunden Kontrollgruppe ergab eine Spezifität von 87,8 %, eine Sensitivität von 85,2 % und eine Genauigkeit von 86,5 %. Bei der Trennung der Seren von Gliompatienten von den Seren der Patienten mit anderen intrakraniellen Tumoren wurde eine Spezifität von 89,5 %, eine Sensitivität von 86,4 % und eine Genauigkeit von 88,0 % erreicht. Die besten Ergebnisse lieferte die Differenzierung der Seren der Gliompatienten von denen der Meningeompatienten mit einer Spezifität von 96,6 %, einer Sensitivität von 80,0 % und einer Genauigkeit von 91,9 %. Ähnlich gute Ergebnisse lieferte die Trennung der Seren von Gliompatienten von denen der nicht-tumorösen Erkrankungen des ZNS, mit einer Spezifität von 81,7 %, einer Sensitivität von 93,2 % und einer Genauigkeit von 87,8 %. Alle Klassifikationsergebnisse waren statistisch signifikant (p-Wert $<10^{-10}$ bei Durchführung von Permutationstests). Die Klassifikationsergebnisse der Trennung der Seren von Gliompatienten von den Seren der Patienten mit anderen intrakraniellen Tumoren sowie von den Seren der Meningeompatienten sind in Abbildung 11 dargestellt.

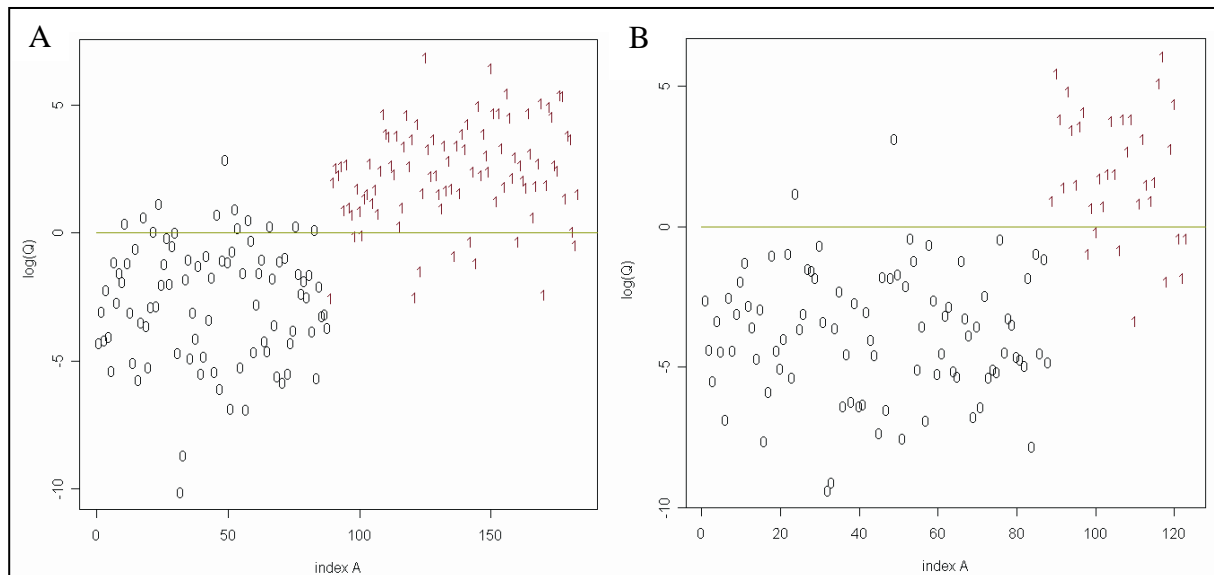


Abb. 11: Klassifikation von Gliomen mittels serologischem Spotassay **A**: Ergebnis der Trennung der Seren von Gliompatienten ("0") und Seren von Patienten mit anderen, intrakraniellen Tumoren ("1"). **B**: Ergebnis der Trennung der Seren von Gliompatienten ("0") und Meningeompatienten ("1"). Auf der x-Achse sind hierbei die Seren (Index) aufgetragen, auf der y-Achse der Logarithmus des Quotienten des *Naïve Bayes* Ansatzes (s. Material und Methoden, Kapitel 2.5.2) Bei einem Wert von < 0 (grüne Linie) wird das Serum als Gliomserum klassifiziert, bei einem Wert > 0 als Kontrollserum.

In beiden Fällen lassen sich die Seren von Gliompatienten ("0") von den Seren der Kontrollgruppen ("1") anschaulich und statistisch trennen.

3.2.1.3 Informationsgehalt Tumor-assoziierten Antigene für die Klassifikation von Gliomen

Um den Informationsgehalt jedes der im serologischen Spotassay verwendeten Antigene zu bestimmen, wurde bereits bei der Klassifikation der Meningeome (Kapitel 3.1.1.1) der Begriff der *Mutual Information* eingeführt. Dieser Wert gibt den Informationsgehalt an, den ein Antigen für eine bestimmte Klassifikationsaufgabe hat. Diese *Mutual Information* wurde analog zu dem Vorgehen bei Meningeomen für die 35 Antigene bestimmt. Die *Mutual Information* für alle Antigene ist in Abbildung 13 grafisch dargestellt.

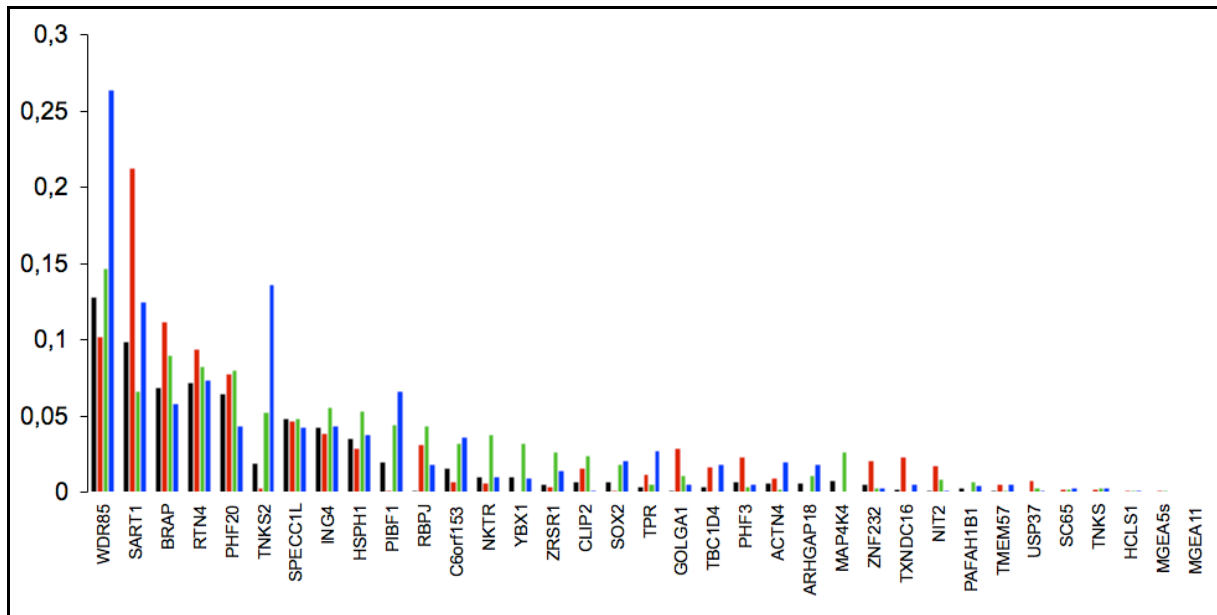


Abb. 12: Informationsgehalt Gliom-assoziiierter Antigene: Die *Mutual Information* (s. Material und Methoden, Kapitel 2.5.1.2) (y-Achse) der einzelnen Antigene (x-Achse) für die Klassifikationsaufgaben: Gliompatienten vs. alle Kontrollgruppen (schwarzer Balken), Gliompatienten vs. gesunde Kontrollprobanden (roter Balken), Gliompatienten vs. Patienten mit anderen, intrakraniellen Tumoren (grüner Balken) und Gliompatienten vs. Patienten mit anderen, nicht tumorösen Erkrankungen des ZNS (blauer Balken).

Das Antigen „*WD repeat domain 85*“ (WDR85) zeigte jeweils den höchsten Informationsgehalt für die Differenzierung der Gliomseren von den Seren aller Kontrollen, für die Differenzierung der Gliomseren von den Seren der Patienten mit neurologischen Erkrankungen sowie für die Differenzierung der Gliomseren von den Seren der Patienten mit anderen intrakraniellen Tumoren. Das Antigen mit dem höchsten Informationsgehalt für die Trennung der Gliome von den gesunden Kontrollen war das Antigen „*nitrilase family, member 2*“ (NIT2). Des Weiteren zeigte sich zum einen, dass die *Mutual Information* eines Antigens für jede der Klassifizierungsaufgaben unterschiedlich sein kann, und zum anderen, dass die *Mutual Information* eines Antigens, welches nur in Gliomseren, nicht aber in Kontrollseren positiv getestet wurde, auch niedriger sein kann als die eines Antigens, welches in unterschiedlicher Frequenz sowohl in Gliomseren als auch in Kontrollseren detektiert wurde. Der Vergleich der *Mutual Information*-Profile zeigt, dass einige Antigene, z. B. „*SPECC1-like*“ (SPECC1L) oder „*inhibitor of growth family, member 4*“ (ING4), ungefähr dieselben Werte für alle vier Aufgaben haben, sie sind also ungefähr gleich gut zur Trennung der Gliomseren von den einzelnen Kontrollgruppen geeignet. Andere Antigene hingegen sind nur für einzelne Klassifizierungsaufgaben von Nutzen. Das Antigen „*progesterone immunomodulatory binding factor 1*“ (PIBF1) ist sehr gut zur Trennung von Gliomseren von Tumoreren bzw. nicht-tumorösen, neurologischen Erkrankungen geeignet, während das Antigen „*squamous cell carcinoma antigen recognized by T cells*“ (SART1) sich eher für die

Unterscheidung von Gliomseren und gesunden Kontrollseren eignet.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass sich Seroreaktivitätsprofile zur Differenzierung der Gliome von anderen Erkrankungen des zentralen Nervensystems eignen. Die untersuchten Gliomseren konnten jeweils mit sehr hoher Spezifität und Sensitivität von Seren der Kontrollgruppen, welche u. a. andere intrakranielle Tumore enthielten, unterschieden werden. Ebenso konnte nochmals gezeigt werden, dass die detektierten Autoantikörperantworten gegen ein Antigen nicht zwingend ausschließlich in Gliomen auftreten dürfen, damit dieses Antigen einen Wert für eine bestimmte Differenzierung hat. Die gesamte Studie wurde in dem Journal „*Clinical Cancer Research*“ veröffentlicht [Ludwig et al., 2008].

3.2.2 Seroreaktivität in Gliomen mittels Proteinmakroarray-Screening

Um dem Ziel der Identifizierung weiterer Gliom-assoziiierter Antigene nachzukommen, wurde eine cDNA-Expressionsbank, welche ca. 38.000 antigentragende Klone enthält, mit insgesamt 30 Seren von Gliompatienten (6 Pools von jeweils 5 Seren) gescreent. Die detektierten Klone wurden zusammen mit weiteren positiven Klonen aus anderen Untersuchungen auf einem Proteinmakroarray zusammengeführt. Dieser bestand aus 1827 immunogenen Klonen, welche immobilisiert auf einer proteinbindenden Membran vorlagen. Details zur Herstellung und Verwendung des Proteinmakroarrays sowie der statistischen Auswertung der Ergebnisse wurden bereits in Kapitel 3.1.4 erläutert.

Zunächst wurden die Seren von 57 Gliompatienten sowie 60 Seren von gesunden Kontrollprobanden auf Seroreaktivität gegenüber den 1827 Antigen-exprimierenden Klonen getestet. Wie bereits in Kapitel 3.1.4 erwähnt, wurde auch in dieser Auswertung das Seroreaktivitätsmuster gegenüber den nach der Normalisierung verbleibenden 1417 immunogenen Klonen (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.5.5) für die Klassifikation von Gliomseren eingesetzt.

3.2.2.1 Klassifikation von Gliomseren

Zunächst sollten die Seren der Gliompatienten von den Seren der gesunden Kontrollen sowie von den Seren der Meningeompatienten als Kontrollgruppe, differenziert werden. Anschließend sollte auch eine Unterscheidung der verschiedenen WHO-Grade der Gliome versucht werden.

Es wurden folgende Klassifikationsaufgaben berechnet: 1) Gliome versus Gesunde; 2) Gliome versus Meningeome; 3) WHO IV Gliome versus Gesunde; 4) WHO IV Gliome versus WHO II / III Gliome; 5) WHO IV Gliome versus WHO II Gliome; 6) WHO II Gliome versus Gesunde; 7) WHO III Gliome versus Gesunde. Die Klassifikation von Gliomseren versus gesunde Kontrollen anhand des erhaltenen Seroreaktivitätsmusters erreichte eine Spezifität von 90,3 %, eine Sensitivität von 87,3 % und eine Genauigkeit von 88,8 % (siehe Tab. 22). Das bedeutet, dass 90,3 % der als Normalseren klassifizierten Seren sowie 87,3 % der als Gliomseren klassifizierten Seren auch tatsächlich Normal- bzw. Gliomseren sind und somit mithilfe des statistischen Modells korrekt klassifiziert wurden. Die Differenzierung von

Glioblastomseren von gesunden Kontrollen wies mit einer Spezifität von 98,5 %, einer Sensitivität von 80,9 % und einer Genauigkeit von 92,9 % noch bessere Werte auf. Die geringe Spannweite des 95 %-Konfidenzintervalls von unter einem Prozentpunkt zeigt die Stabilität des verwendeten statistischen Modells bei den erfolgreichen Klassifikationen an (für Erläuterungen siehe Kapitel 3.1.4.1). Die Ergebnisse der Differenzierung von Gliomen und Meningeomen wurde bereits in Kapitel 3.1.4.1 besprochen. Die Ergebnisse der anderen getesteten Klassifizierungen waren statistisch nicht signifikant. Exemplarisch sind die Werte für Spezifität, Sensitivität und Genauigkeit für die Klassifikation von WHO IV versus WHO II / III Gliomen in Tabelle 22 mit aufgeführt. Die Genauigkeit dieser Klassifikation lag bei nur 50,8 %, d. h. dass ca. 51 % der getesteten Seren von dem statistischen Modell korrekt klassifiziert wurden. Da dies auch mit zufälligem Raten erreicht werden kann, kann man schlussfolgern, dass das verwendete Modell für die Differenzierung von Glioblastomen von niedergradigen Gliomen nicht geeignet ist. Im weiteren Verlauf werden nur die erfolgreichen Klassifikationsszenarien weiter erläutert.

Tab. 22 Klassifikation von Gliomen mittels Proteinmakroarray

Klassifikation	Spezifität [%]	Sensitivität [%]	Genauigkeit [%]
Gliome vs. Gesunde	90,3 [89,90-90,67]	87,3 [86,82-87,81]	88,8 [88,50-89,17]
Kontrolle	51,0 [49,82-52,25]	47,5 [46,06-48,88]	49,3 [48,14-50,45]
WHO IV vs. Gesunde	98,5 [98,22-98,68]	80,9 [80,48-81,37]	92,9 [92,66-93,09]
Kontrolle	73,5 [72,40-74,64]	24,0 [22,19-25,73]	57,8 [56,67-58,83]
WHO IV vs. WHO II/III Gliome	42,9 [42,06-43,67]	57,0 [56,01-57,99]	50,8 [50,13-51,43]
Kontrolle	41,4 [39,19-43,54]	56,8 [55,24-58,33]	50,0 [48,45-51,55]

In eckigen Klammern ist jeweils das 95 % Konfidenzintervall angegeben. Die Werte für die jeweilige Kontrolle beziehen sich auf die stratifizierte Permutation, siehe Material und Methoden, Kapitel 2.5.5 oder Ergebnisse Kapitel 3.1.4.1

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der verwendete Proteinmakroarray mit 1827 immunogenen Klonen sehr gut für eine Differenzierung der Seren von sowohl Gliom- als auch Glioblastompatienten von gesunden Kontrollen geeignet ist. Für beide Klassifikationen wurden hohe Werte für Sensitivität und Spezifität erreicht. Eine Differenzierung der einzelnen WHO-Grade innerhalb der Gliome war mit diesem Modell nicht möglich. Damit eine solche Differenzierung möglich wäre, müssten noch weitere Gliom-assoziierte Antigene identifiziert und analysiert werden. Die generelle Verwendbarkeit von Seroreaktivitätsprofilen zur Differenzierung von Gliomen konnte aber gezeigt werden.

3.2.2.2 Frequenz der Seroreaktivität gegenüber den Antigenen in Gliom- und Normalseren

Analog zu dem Vorgehen bei Meningeomen (Kapitel 3.1.4.2) wurde zunächst die Frequenz der Seroreaktivität gegen die 1417 immunogenen Klone in den 57 Gliomseren und den 60 Normalseren ermittelt (Tabelle 23). Gegen 51 Klone, darunter 17 *in-frame* Klone, konnten keine Autoantikörper in den Seren der untersuchten Gliompatienten detektiert werden. In der Gruppe der Normalseren konnten gegen 176 Klone, darunter 62 *in-frame* Klone, keine Autoantikörper nachgewiesen werden. Autoantikörper in den Seren von über 60 % der Gliompatienten konnten gegen insgesamt 23 Klone, darunter vier *in-frame* Klone, festgestellt werden. Eine Frequenz von über 60 % in den getesteten Normalseren zeigten 43 Klone, darunter sieben *in-frame* Klone.

Tab. 23: Häufigkeit von Autoantikörperreaktionen bei Gliompatienten im Proteinmakroarray

Frequenz	Gliome		Gesunde		Gliome*	
	Anzahl Klone (Gesamt)	Anzahl Klone (in-frame)	Anzahl Klone (Gesamt)	Anzahl Klone (in-frame)	Anzahl Klone (Gesamt)	Anzahl Klone (in-frame)
0 %	51	17	176	62	-	-
0 – 10 %	536	176	552	169	152	91
10 – 20 %	444	117	305	78	109	49
20 – 30 %	187	40	163	36	34	5
30 – 40 %	100	20	93	22	7	2
40 – 50 %	54	14	55	8	3	0
50 – 60 %	22	3	30	9	2	0
60 – 70 %	16	4	27	5	1	0
70 – 80 %	4	0	11	2	0	0
80 – 90 %	3	0	4	0	0	0
90 – 100 %	0	0	1	0	0	0

* Hier sind nur die Klone berücksichtigt, deren Frequenz in Gliomen mindestens doppelt so hoch ist wie in Gesunden. **Fett** = näher zu betrachtende *in-frame* Klone, siehe Tabelle 24

Analog zu der Betrachtung bei Meningeomen wurden im Weiteren nur die *in-frame* Klone näher betrachtet, die erstens eine Häufigkeit der Autoantikörperantwort in Gliompatienten von über 20 % zeigten und zweitens gegen die Autoantikörper in mindestens doppelt so vielen, getesteten Gliomseren festgestellt wurden wie in Normalseren. Das ist für 47 Klone, darunter sieben *in-frame* Klone, der Fall. Fünf dieser Klone zeigten eine Seroreaktivität in 20 - 30 % der Meningeomseren, zwei Klone wiesen eine Seroreaktivität in 30 - 40 % der Meningeomseren auf. Die Identität dieser Klone ist in Tabelle 24 angegeben.

Tab. 24: Frequenz häufig detektierter Autoantikörper in Gliomen

Klon ID	Ensemble ID	Genname	Frequenz Gliome [%]	Frequenz Gesunde [%]	als Antigen bekannt*
K09567	ENSG00000187736	NHEJ1	36,84	18,33	
M24570	ENSG00000004534	RBM6	33,93	16,67	
C07557	ENSG00000197907		26,32	11,67	
G11565	ENSG00000101460	MAP1LC3A	26,32	11,67	
K19538	ENSG00000182670	TTC3	26,32	6,67	+
B14594	ENSG00000114942	EEF1B2	22,81	8,47	
M15565	ENSG00000166313	APBB1	21,05	10,00	

*Gen als Antigen in der „*Cancer Immunome Database*“ niedergelegt

Der Klon mit der höchsten Frequenz in Gliomen enthält die Sequenz des Gens „*nonhomologous end-joining factor 1*“ (NHEJ1). Es konnte eine Seroreaktivität von 36,8 % in Gliomseren und eine Seroreaktivität von 18,3 % in Normalseren für diesen Klon ermittelt werden. Ein weiterer Klon mit hoher Seroreaktivität in Gliomen repräsentiert das Gen „*tetratricopeptide repeat protein 3*“ (TTC3), welches bereits als Antigen in der „*Cancer Immunome Database*“ niedergelegt ist. Hier zeigte sich eine Frequenz von 26,3 % in Gliomseren und 6,7 % in Normalseren.

3.2.2.3 Klassifikations-relevante Antigene in Gliomen

Als Maß für den Informationsgehalt eines Klons für eine bestimmte Klassifikationsaufgabe wurde auch hier analog zu der Betrachtung der Meningeome in Kapitel 3.1.4.3 der AUC-Wert verwendet. Tabelle 25 enthält eine Übersicht über die Verteilung der AUC-Werte für die Klassifikationen Gliome versus gesunde Kontrollen und WHO IV Gliome versus gesunde Kontrollen.

Tab. 25: Überblick über die Verteilung der AUC Werte für die Klassifikation von Gliomen

AUC Werte	Gliome vs. Gesunde		Glioblastome vs. Gesunde	
	Anzahl Klone (Gesamt)	Anzahl Klone (in-frame)	Anzahl Klone (Gesamt)	Anzahl Klone (in-frame)
0.0-0.1	0	0	0	0
0.1-0.2	0	0	4	3
0.2-0.3	38	16	55	22
0.3-0.4	219	69	218	71
0.4-0.5	513	166	455	149
0.5-0.6	506	140	452	113
0.6-0.7	133	0	201	32
0.7-0.8	8	0	30	1
0.8-0.9	0	0	2	0

Fett = Klassifikations-relevante Antigene, siehe Tabelle 26

Ähnlich wie bei den Meningeomen, sind auch hier ca. 95 % der Klone nicht informativ für die jeweilige Trennung. Insgesamt besaßen 46 Klone, darunter 16 *in-frame* Klone, einen hohen

Informationsgehalt für die Trennung von Gliomen und gesunden Kontrollen. Für die Differenzierung von Glioblastomen versus gesunde Kontrollen zeigten 91 Klone, darunter 26 *in-frame* Klone, hohe AUC-Werte. Die Identität der *in-frame* Klone mit hohem Informationsgehalt für die Differenzierung von Gliomen versus gesunde Kontrollen bzw. Glioblastomen versus gesunde Kontrollen ist in Tabelle 26 aufgeführt.

Auffällig ist, dass 16 Klone bei beiden Klassifikationen einen hohen Informationsgehalt besitzen. Der Klon mit dem höchsten AUC-Wert für die Trennung Gliome versus Gesunde repräsentiert das Gen „*vimentin*“ (VIM). Dieser Klon ist auch gleichzeitig der beste Klon für die Klassifikation von Glioblastomen versus Gesunde. Die Spotintensitäten für diesen Klon sind in Abbildung 13 dargestellt. Insgesamt zehn der repräsentierten Gene sind bereits als Antigene bekannt und in der „*Cancer Immunome Database*“ als solche niedergelegt. Unter den repräsentierten Genen mit gutem Informationsgehalt sind u. a. auch „*glial fibrillary acidic protein*“ (GFAP), „*pleiotrophin precursor*“ (PTN), „*dihydrolipoyl dehydrogenase*“ (DLD), und „*inhibitor of growth family member 4*“ (ING4). Diese Antigene, zusammen mit VIM, wurden bereits im Zusammenhang mit Gliomen beschrieben.

Tab. 26: Klassifikations-relevante Antigene in Gliomen

Klon ID	Ensemble ID	Genname	AUC Gliome vs Gesunde	AUC Glioblastome vs Gesunde	als Antigen bekannt*
B17512	ENSG00000026025	VIM	0,225	0,173	+
M19590	ENSG00000140988	RPS2	0,226	0,188	+
K19595	ENSG00000142937	RPS8	0,232	0,175	
J15577	ENSG00000026025	VIM	0,247	0,261	+
F16565	ENSG00000083812	ZNF324	0,248	0,275	
G19583	ENSG00000122406	RPL5	0,251	0,261	
H18530	ENSG00000091140	DLD	0,258	0,263	
E14506	ENSG00000198708	LOC388720	0,265	0,236	
G20580	ENSG00000105220	GPI	0,266	0,255	
G13583	ENSG00000167588	GPD1	0,282	0,235	
D14506	ENSG00000198708	LOC388720	0,287	0,279	
O03589	ENSG00000140988	RPS2	0,289	0,242	+
C09514	ENSG00000170759	KIF5B	0,291	0,289	
H22512	ENSG00000125817	CENPB	0,292	0,288	+
H23512	ENSG00000180626	ZNF594	0,293	0,282	+
F10567	ENSG00000005194	CIAPIN1	0,293	0,285	
K19538	ENSG00000182670	TTC3	0,304	0,254	+
I17585	ENSG00000127903	FLJ12955.	0,314	0,266	
D18552	ENSG00000153317	DDEF1	0,306	0,279	
O11577	ENSG00000105894	PTN	0,308	0,279	
H21512	ENSG00000131095	GFAP	0,325	0,277	+
F12523	ENSG00000075340	ADD2	0,349	0,279	
M18573	ENSG00000111653	ING4	0,309	0,288	
O20573	ENSG00000151914	DST	0,316	0,292	+
M15565	ENSG00000166313	APBB1	0,332	0,294	
B09544	ENSG00000106244	PDAP1	0,664	0,714	+

* Gen als Antigen in der „*Cancer Immunome Database*“ niedergelegt, **Fett** = als informativ angesehene AUC-Werte

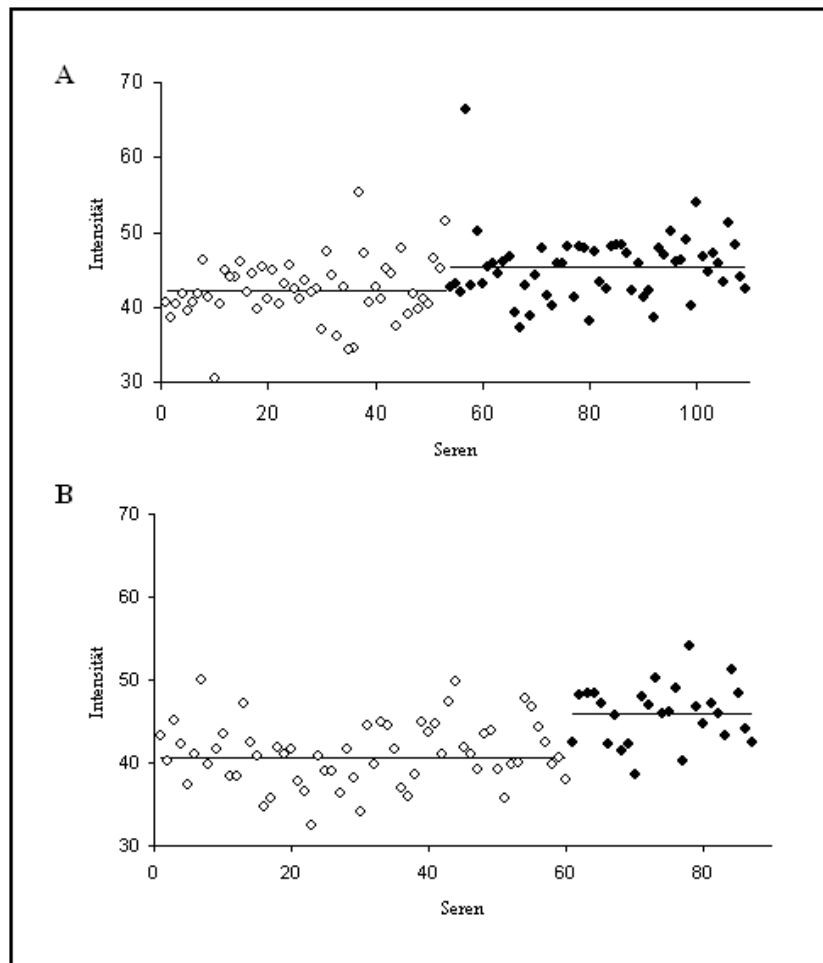


Abb. 13: Seroreaktivität gegenüber dem Klon VIM. **A:** Seroreaktivität gegenüber dem Klon VIM in gesunden Kontrollen (leere Kreise) und Gliomen (gefüllte Kreise). **B:** Seroreaktivität gegenüber dem Klon VIM in gesunden Kontrollen (leere Kreise) und WHO IV Gliomen (gefüllte Kreise).

Zusammenfassend konnte diese Arbeit weitere Einblicke in die Autoimmunantwort gegenüber Gliomen liefern. Zum einen konnte nachgewiesen werden, dass Seroreaktivitätsmuster sehr gut zur Differenzierung von Gliomseren von Kontrollen geeignet sind. Zum anderen zeigten die Untersuchungen aber auch, dass es noch weitere Gliom-assoziierte Antigene geben muss, welche möglicherweise die Differenzierung von Gliomen unterschiedlichen WHO-Grades basierend auf Seroreaktivitätsmustern ermöglichen könnten. Des Weiteren konnten viele Antigene, welche bereits in anderen Krebspatienten als immunogen beschrieben worden sind, nun auch in Zusammenhang mit Gliomen gebracht werden. Auch konnte z. T. erstmals eine Immunantwort in Gliompatienten gegen Proteine nachgewiesen werden, deren Expression in Gliomen bereits gezeigt wurde. Die gesamten Daten zu der Klassifizierung der Gliome mithilfe des Proteinmakroarrays wurden zu einem Manuskript zusammengetragen.

Diskussion

4.1 Meningeome

4.1.1 Klassifikation von Meningeomen anhand von Seroreaktivitätsmustern mittels serologischem Spotassay

Die Arbeitsgruppe Comtesse et al. hat in Vorarbeiten bereits 57 Meningeom-assoziierte Antigene mithilfe des SEREX-Verfahrens identifiziert und erste Analysen zur Häufigkeit der Seroreaktivität gegenüber diesen Antigenen in 24 Meningeom- und 24 Kontrollseren durchgeführt [Comtesse et al., 2005]. Für eine statistisch solidere Aussage wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst weitere Seren von Meningeompatienten und gesunden Kontrollprobanden untersucht. Die Ergebnisse wurden mit denen von Comtesse et al. zusammengefasst und in dem Journal „*BMC Bioinformatics*“ veröffentlicht [Keller et al., 2006].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Seroreaktivität gegenüber diesen 57 Meningeom-assoziierten Antigenen in 93 Meningeompatienten und 90 gesunden Kontrollprobanden analysiert. Unter Verwendung von statistischen Lernverfahren konnten die Seren der getesteten Meningeompatienten von den Seren der gesunden Kontrollprobanden anhand ihres Seroreaktivitätsmusters gegenüber den 57 Meningeom-assoziierten Antigenen mit einer Genauigkeit von 90,3 % klassifiziert werden. Das bedeutet, dass von 100 getesteten Seren insgesamt 90 Seren korrekt als Meningeom oder Gesund eingeordnet wurden. Betrachtet man lediglich die Subgruppe der WHO I Meningeome und versucht diese von den gesunden Kontrollen anhand der Autoantikörperantwort zu trennen, so werden sogar 95 von 100 getesteten Seren korrekt klassifiziert. Damit wurde gezeigt, dass es sehr wohl ein spezifisches Muster an Autoantikörperreaktionen in Meningeompatienten gibt und dieses auch prinzipiell für eine Unterscheidung von Meningeomen und Gesunden geeignet ist.

Offen blieb die Frage nach der benötigten Anzahl an Tumorantigenen, die für eine Unterscheidung von Meningeomen und Gesunden notwendig ist. Um diese zu beantworten, wurde versucht, die Anzahl der betrachteten Meningeom-assoziierten Antigene zu minimieren, ohne dabei an diagnostischer Genauigkeit einzubüßen. So konnte die Anzahl an Meningeom-assoziierten Antigenen für die Unterscheidung von Meningeomen und Gesunden auf nur 38 von 57 reduziert werden, wobei immer noch eine diagnostische Genauigkeit von ca. 90 % erhalten blieb. Für die Unterscheidung von *common-type* Meningeomen von

Gesunden waren sogar nur 12 der 57 Antigene notwendig. Dies zeigt deutlich, dass einige Antigene für eine bestimmte Trennung wichtiger sind als andere, und dass die reine Erhöhung der Anzahl an untersuchten Tumor-assoziierten Antigenen nicht zwingend zu einer Verbesserung der diagnostischen Genauigkeit führen muss.

Jedweder Anwendung einer solchen auf Autoantikörperreaktionen basierenden Erkennung von Meningeomen in der Klinik stehen noch zahlreiche Probleme entgegen. Zum einen sind Meningeome sehr seltene Tumore, die jährliche Inzidenz liegt bei nur 5,35 von 100.000 Personen [CBTRUS, 2008]. Aufgrund dieser Seltenheit wäre ein solcher Screeningtest als eine Art Vorsorgeuntersuchung, wie er z. B. bei Prostatakrebs üblich ist, für Meningeome nicht sinnvoll. Zum anderen sind Meningeome benigne Tumore, die nur langsam wachsen, selten progredieren und zu einem großen Teil asymptomatisch bleiben. Die Diagnose Meningeom ist somit oft ein Zufallsbefund. In einer älteren Studie wurden in 1,4 % der durchgeführten Autopsien Meningeome gefunden [Rausing et al., 1970]. Neuere Studien zeigen ein ähnliches Bild. Eine Untersuchung von 2000 Menschen mit Magnet-Resonanz-Tomographen ergab eine Frequenz von asymptomatischen Meningeomen von 0,9 % [Vernooij et al., 2007]. Diese asymptomatischen Meningeome werden v. a. in älteren Patienten meist nur zuwartend beobachtet. Auch lassen sich für sporadische Meningeome im Gegensatz zu z. B. Darm- oder Brustkrebs keine Risikogruppen definieren, für die ein Screeningtest als Vorsorgeuntersuchung sinnvoll wäre. Daher macht eine solche indirekte Erkennung von Meningeomen vom klinischen Standpunkt her nur Sinn bei bereits bestehendem Verdacht auf ein Meningeom. Auch eine Anwendung als Hilfestellung für eine Unterscheidung von Meningeomen und anderen intrakraniellen Tumoren, bei der Abgrenzung von *common type* Meningeomen von höhergradigen Meningeomen oder bei der Risikoabschätzung einer Rezidivbildung ist denkbar. Für alle genannten potenziellen Anwendungsgebiete ist die Identifizierung weiterer Meningeom-assoziiierter Antigene angezeigt, welche die diagnostische Genauigkeit weiter erhöhen.

4.1.2 Klassifikation von Meningeomen anhand von Seroreaktivitätsmustern mittels Proteinmakroarray

Um die Zahl Meningeom-assoziiierter Antigene weiter zu erhöhen, wurde ein Proteinmakroarray bestehend aus *E. coli* exprimierten humanen Proteinen mit weiteren Seren von Meningeompatienten untersucht. Auch hier wurden mit statistischen Methoden spezifische Seroreaktivitätsmuster erstellt, welche die 53 untersuchten Meningeome von den 60 untersuchten gesunden Kontrollen differenzieren. Im Vergleich zu den Ergebnissen des serologischen Spotassays gelang dies mit noch höherer diagnostischer Genauigkeit. Anhand ihres Seroreaktivitätsmusters gegenüber den 1417 immunogenen Klonen war es möglich, die Seren von Meningeompatienten von denen der gesunden Kontrollen mit einer Genauigkeit von fast 94 % zu trennen. Das bedeutet, dass von allen getesteten Seren 94 von 100 korrekt klassifiziert wurden. Darüber hinaus konnten die Seren der Meningeompatienten sogar von den Seren der Gliompatienten mit einer Genauigkeit von 88 % differenziert werden. Dies zeigt, dass spezifische Seroreaktivitätsmuster auch zur indirekten Unterscheidung von Meningeompatienten und Gliompatienten geeignet sind.

Um eine Trennung von Meningeomen und Kontrollen basierend auf Seroreaktivitätsmustern mit sehr hoher Spezifität und Sensitivität zu erreichen, reicht es nicht aus, die Anzahl der immunogenen Antigene zu erhöhen. Es müssen gleichzeitig die Antigene identifiziert werden, welche den höchsten Informationsgehalt für diese Trennung beinhalten. Einige der hier identifizierten Antigene sind bereits als Tumor-assoziierte Antigene in der „*Cancer Immunome Database*“ niedergelegt, darunter auch „*IQ motif and WD repeats 1*“ (IQWD1). Das Antigen IQWD1 und ein weiteres Antigen, „*dihydrolipoyl dehydrogenase*“ (DLD), wurden bereits von Comtesse et al. mit der SEREX-Methode als Meningeom-assoziierte Antigene identifiziert [Comtesse et al., 2005]. In der vorliegenden Arbeit wurden in 32 % der Seren der Meningeompatienten Autoantikörper gegen IQWD1 und in 15 % Autoantikörper gegen DLD detektiert. Allerdings konnten auch Autoantikörper gegen IQWD1 in 17 % bzw. gegen DLD in 3 % der gesunden Kontrollprobanden festgestellt werden. Trotz des Auftretens von Autoantikörpern in gesunden Probanden zeigten beide Proteine auch in dem Screening mit dem Proteinmakroarray gute AUC-Werte und waren so sehr wertvoll für die Differenzierung. Ein weiteres für die Differenzierung von Meningeomen und Gesunden sehr wertvolles Antigen war „*enolase 1*“ (ENO1). Dieses Antigen zeigte den höchsten diagnostischen Informationsgehalt für die Trennung von Meningeomen und Gesunden und

wurde als Antigen bereits mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen, u. a. Morbus Crohn, Colitis Ulzerosa oder systemischer Lupus erythematoses in Verbindung gebracht [Übersicht in Pancholi, 2001]. Das Antigen mit dem höchsten Informationsgehalt für die Unterscheidung von Meningeomen und Gliomen war das Antigen „*sorbin and SH3 domain containing 2*“ (SORBS2), besser bekannt unter dem Namen „*Arg binding protein 2*“ (ARGBP2), welches bereits in Zusammenhang mit Krebs der Bauchspeicheldrüse gebracht wurde, wo es eine Rolle in der Tumorzellmigration sowie der Zelladhäsion spielt [Taieb et al., 2008].

Der geringe Überlapp zwischen den durch SEREX identifizierten Meningeom-assoziierten Antigenen und denen durch den Proteinmakroarray identifizierten legt die Vermutung nahe, dass das Potenzial beider Methoden noch nicht ausgereizt ist und dass es noch deutlich mehr Meningeom-assoziierte Antigene gibt als bisher gefunden wurden. Es konnte eine Trennung von Meningeomen und Gesunden sowohl mithilfe des serologischen Spotassays, als auch mithilfe des Proteinmakroarrays von über 90 % Genauigkeit erreicht werden. Es war sogar möglich Meningeome von Gliomen statistisch zu trennen. Dies zeigt, dass das für Meningeompatienten identifizierte Seroreaktivitätsmuster auch für die Unterscheidung von Meningeom- und Gliompatienten geeignet ist. Die bereits jetzt erreichte diagnostische Genauigkeit liefert den Beweis, dass es ein spezifisches Muster an Autoantikörperreaktionen in Meningeompatienten gibt, welches sich zur indirekten Erkennung von Meningeomen und sogar zur indirekten Unterscheidung von Meningeomen und Gliomen als weitere intrakraniellen Tumoren eignet.

4.1.3 Veränderungen der Genexpression in Meningeomen

Es wurden bereits einige veränderte Gene im Zusammenhang mit Meningeomen beschrieben. Am bekanntesten ist hier der Verlust der Genexpression des Tumorsuppressorgens NF2 auf Chromosom 22, sei es durch Verlust der Heterozygotie des Gens auf chromosomaler Ebene oder durch Inaktivierung des Gens, welches als sehr frühes Ereignis in der Pathogenese von Meningeomen gesehen wird. Dieser Verlust der Heterozygotie wurde in bis zu 60 % aller sporadisch auftretenden Meningeome gefunden [Ruttledge et al., 1994; Harada et al., 1996]. In einer Serie wurde in 87 % der Meningeome mit LOH22 eine Mutation im NF2-Gen gefunden [Wellenreuther et al., 1995]. Andere mögliche Tumorsuppressorgene auf Chromosom 22, welche eine Rolle bei der Entstehung von Meningeomen spielen könnten, sind die Gene BAM22, LARGE, INI1 und MN1 [Peyrard et al., 1994; Peyrard et al., 1999; Schmitz et al., 2001; Lekan-Deprez et al., 1995]. Auch verschiedene Rezeptoren, u. a. PDGFR, EGFR, IGFR, VEGFR sowie Progesteron- und Estrogenrezeptoren, werden im Zusammenhang mit der Meningeomentstehung oder Progression diskutiert [Sanson und Cornu, 2000]. Gene, die ebenfalls mit der Progression von Meningeomen in Verbindung gebracht werden, sind u. a. CDKN2A, CDKN2B und p14^{ARF}, deren Expressionsverlust in höhergradigen Meningeomen eine Inaktivierung des G1/S-Phase-Checkpoints des Zellzyklus hervorrufen [Bostrom et al., 2001; Simon et al., 2007].

Es wurden bereits verschiedene Veränderungen in wichtigen Signalwegen in Meningeomen beschrieben. Cuevas et al. zeigten eine Überexpression einzelner Komponenten des Notch-Signalweges, u. a. von HES1 und den Rezeptoren von Notch1 und Notch2 [Cuevas et al., 2005]. Der Notch-Signalweg spielt eine Rolle bei der Differenzierung von Zellen und bei der lateralen Inhibition. Eine Rolle bei der Proliferation, der Apoptose und des aggressiven Wachstums von anaplastischen Meningeomen spielen möglicherweise der Phospho-Inositol3-Kinase/Akt-Signalweg sowie der Map-Kinase-Signalweg, welche in malignen Meningeomen aktiviert sind [Mawrin et al., 2005]. Der Wnt-Signalweg spielt möglicherweise eine Rolle bei der Zelladhäsion von Meningeomen, u. a. durch seine Effektorproteine Beta-Catenin und E-Cadherin [Howng et al., 2002; Brunner et al., 2006].

Ein Teilziel dieser Arbeit bestand darin, die bereits während meiner Diplomarbeit erhobenen Microarray-Expressionsdaten von Meningeomen mithilfe des neu entwickelten Web-Tools „GeneTrailExpress“ statistisch auszuwerten, um so weitere Einblicke in deregulierte

Signalwege in Meningeomen zu erhalten [Backes et al., 2007; Keller et al., 2008b]. Insbesondere sollte hier das sogenannte „Gene Set Enrichment“-Verfahren (GSEA) Anwendung finden, welches nicht auf vorher definierte Schwellenwerte für Über- bzw. Unterexpression von Genen angewiesen ist, sondern das ganze Expressionsprofil für die Analyse von deregulierten Signalwegen einbezieht.

Es wurden bereits sechs Expressionsstudien über Meningeome mithilfe von Microarray-Analysen veröffentlicht. Tabelle 27 enthält eine Übersicht über die Größe dieser Studien, sowohl in Bezug auf die Anzahl der untersuchten Transkripte, als auch in Bezug auf die Anzahl der untersuchten Meningeome, sowie über die durchgeführten Expressionsvergleiche. Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse, welche kürzlich in dem Journal „*International Journal of Cancer*“ veröffentlicht wurden, sind ebenfalls aufgeführt.

Tab. 27: Veröffentlichte Microarray-Studien bei Meningeomen

Studie	Anzahl Transkripte	Anzahl Meningeome	Genexpression
Watson et al., 2002	2.059	15 (6 MI, 6 MII, 3 MIII)	Meningeome vs Leptomeningen, MI vs MII/III
Fatallah-Shayk et al., 2003	19.200	10	Meningeome vs Normalhirn
Wrobel et al., 2005	2.600	30 (13 MI, 12 MII, 5 MIII)	MI vs MII, MI vs MIII, MII vs MIII, MI vs MII/III, MI/II vs MIII
Sayagués et al., 2006	18.400	18 MI (11 intrakranial, 7 spinal)	Intrakraniale Meningeome vs spinale Meningeome
Carvalho et al., 2007	47.000	23 (8 MI, 7 MII, 8 MIII)	MI vs MIII
Aarhus et al., 2008	16.430	27 (22 MI, 5 MII)	Meningeome vs arachnoidale Zyste, fibröse Meningeome vs meningotheleale Meningeome
Keller und Ludwig et al., 2009*	55.000	24 (8 MI, 8 MII, 8 MIII)	Meningeome vs Dura, MI vs MII/III, meningotheleale/syncitiale Meningeome vs fibroblastische Meningeome

MI= Meningeom WHO-Grad I; MII= Meningeom WHO-Grad II; MIII= Meningeom WHO Grad III; vs= versus
 *entspricht vorliegender Arbeit

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine Verringerung der generellen Genexpression in Meningeomen, was mit den Daten von Watson et al. einhergeht, die ebenfalls überwiegend niedriger exprimierte Gene in Meningeomen fanden [Watson et al., 2002]. Dies liegt möglicherweise darin begründet, dass chromosomale Verluste in Meningeomen häufiger sind als Zugewinne und somit auch eine verringerte Genexpression der verbleibenden Gene zu erwarten ist.

Es konnte auch eine differenzielle Expression für Gene nachgewiesen werden, deren Expressionsveränderung in Meningeomen bereits bekannt war, was für die Qualität der

erhaltenen Daten spricht. Es konnte z. B. eine Überexpression des Transkriptionsfaktors HES1 in Meningeomen gezeigt werden. Dies wurde bereits in der Studie von Fatallah et al. mittels Microarrays und in der Studie von Cuevas et al. mithilfe von Immunhistochemie gezeigt [Fatallah-Shayk et al., 2003; Cuevas et al., 2005].

Die Analyse von deregulierten Signalwegen in Meningeomen ergab überwiegend herunter-regulierte Signalwege. So wurden einige Gene, welche zu den KEGG-Signalwegen Zelladhäsion und ECM-Rezeptor Interaktion gezählt werden, in Meningeomen unterexprimiert. Dies liefert möglicherweise eine weitere Erklärung für eine Veränderung der Zellmotilität und –adhäsion in Meningeomen, welche bereits mit dem NF2-Genprodukt *merlin* in Verbindung gebracht wurde [Gutmann et al., 1999]. Ebenfalls konnte eine Herunter-Regulierung von Signalwegen im Zusammenhang mit dem Immunsystem, nämlich Komplement- und Gerinnungs-Kaskaden und NK-vermittelte Zytotoxizität, festgestellt werden. Die Expression von Komplement-regulierenden Proteinen auf der Zelloberfläche von Tumorzellen wurde bereits im Zusammenhang mit der Nichterkennung des Tumors durch das Immunsystem diskutiert [Shinoura et al., 1994; Donin et al., 2002]. Die Hoch-Regulierung einiger metabolischer Signalwege in Meningeomen könnte für eine erhöhte Proliferation und damit Stoffwechselaktivität in den Tumorzellen sprechen.

Die Analyse der chromosomalen Lokalisation von differenziell exprimierten Genen in Meningeomen ergab eine Häufung von unterexprimierten Genen in Meningeomen auf dem langen Arm von Chromosom 22 sowie in höhergradigen Meningeomen auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 und auf dem langen Arm von Chromosom 14. Die Deletion von 22q wurde in 40 - 70 % der niedergradigen Meningeome gefunden, die Deletion von 1p und 14q in 40 - 100 % der höhergradigen Meningeome [Louis et al., 2007]. Hier konnte gezeigt werden, dass auch die Genexpression von Genen, welche auf diesen Chromosomenarmen liegen, verringert ist. Speziell für Chromosom 1 konnte eine signifikante Unterexpression des Gens ALPL in WHO II / III Meningeomen festgestellt werden. Der Verlust der Expression von ALPL in Meningeomen wurde bereits in zahlreichen immunhistochemischen Untersuchungen gezeigt und ist auch mit der Progression zu höhergradigen Meningeomen assoziiert [Müller et al., 1999].

4.1.4 Zusammenhang zwischen Immunogenität und Überexpression am Beispiel Meningeom-assoziiierter Antigene

Die Gründe, warum körpereigene Proteine speziell in Tumorpatienten eine Immunantwort auslösen, sind vielfältig. Immer wieder diskutiert werden u. a. Mutationen, Überexpression, veränderte zelluläre Lokalisation oder posttranslationale Modifikation der Proteine im Tumor sowie Freisetzung intrazellulärer Proteine in Zusammenhang mit Nekrose oder Apoptose der Tumorzellen [Anderson und LaBaer, 2005; Casiano et al., 2006]. Viele dieser Hypothesen wurden aber, wenn überhaupt, nur in Einzelfällen gezeigt. Dies lässt vermuten, dass die Gründe für die Immunogenität eines Proteins sowohl von der Tumorart, als auch von dem individuellen Patienten und dem Protein selbst abhängig ist.

Mit dem rechnergestützten System CAP („*Cancer associated protein database*“), welches am Zentrum für Bioinformatik in Saarbrücken zur Analyse von Tumor-assoziierten Antigenen entwickelt wurde, konnte kein kausaler Zusammenhang zwischen Mutationen und Immunogenität gezeigt werden [Dönnes et al., 2004]. Auch die Sequenzanalyse von MGEA6, GLEA2 und EIF4G als Tumor-assoziierte Antigene in Meningeomen, Gliomen und Lungenkrebs, respektive, zeigte keine Mutationen [Fischer 2001; Bauer et al., 2001; Comtesse et al., 2002]. Dies legt die Vermutung nahe, dass in diesen Fällen eine andere Ursache für die Auslösung der Immunogenität gegenüber den Tumorantigenen eine Rolle spielt, möglicherweise sogar die Überexpression.

In dieser Arbeit wurde nun zum ersten Mal versucht, die Genexpression von Tumor-assoziierten Antigenen direkt mit dem Auftreten der Autoantikörper gegenüber diesen in autologen Patienten in Zusammenhang zu bringen. Hierzu wurde die Expression von 35 Meningeom-assoziierten Antigenen in den 24 in der Microarray-Studie untersuchten Meningeomen mit dem Auftreten von Autoantikörpern gegen diese 35 Antigene in den Seren dieser Patienten verglichen. Die Ergebnisse dieser Studie wurden in dem Journal „*Gene Therapy*“ 2008 veröffentlicht [Keller und Ludwig et al., 2008].

Bei Betrachtung aller 24 Meningeome zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Überexpression von Meningeom-assoziierten Antigenen und dem Auftreten von Autoantikörpern im selben Patienten. Bei Beschränkung auf die *common-type* Meningeome jedoch zeigte sich eine signifikante Überexpression Meningeom-assoziiierter Antigene in den

Patienten, in welchen auch eine humorale Immunantwort gegenüber diesen Antigenen nachweisbar war. Dies legt die Vermutung nahe, dass in benignen Meningeomen, welche auch genetisch eher stabil sind und nur wenige chromosomale Aberrationen aufweisen, die Überexpression von Proteinen für ihre Immunogenität eine Rolle spielt, während in atypischen und anaplastischen Meningeomen, welche eine größere Anzahl an chromosomalen Veränderungen aufweisen, möglicherweise ein anderer Mechanismus für die Immunogenität verantwortlich ist.

Ein besonders starker Zusammenhang zwischen Überexpression und Immunogenität in Patienten mit *common type* Meningeomen wurde für die Antigene „*thioredoxin domain containing 16*“ (TXNDC16), „*SWAP70-protein*“ (SWAP70) und „*reticulon 4*“ (RTN4) gefunden. Das RTN4-Protein ist ein Bestandteil der Myelinscheide im ZNS und inhibiert das Wachstum von Neuriten im adulten Gehirn [Spillmann et al., 1998]. SWAP70 gilt als ein Verwandter von Rac, welches Signale von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen auf einem von Ras unabhängigen Weg zu Rac weiterleitet [Shinohara et al., 2002]. TXNDC16, welches vorher als KIAA1344 bezeichnet wurde, zeigte sich in der vorliegenden Arbeit als besonders wertvolles Antigen zur Unterscheidung von Meningeomen und Gesunden. Möglicherweise können solche überexprimierten, immunogenen Proteine in Meningeomen in Zukunft als Targets für eine Meningeom-spezifische Therapie in Betracht gezogen werden. Hierzu sind allerdings noch umfangreiche Studien zur Gewebeexpression der Antigene notwendig. Eine weitere Grundvoraussetzung für eine Therapie basierend auf Meningeom-assoziierten Antigenen ist der Nachweis einer zellulären Immunantwort, neben der bereits gezeigten humoralen Immunantwort, gegen diese Proteine. Dies ist bisher erst bei einer geringen Zahl an Tumor-assoziierten Antigenen gelungen, u. a. bei dem NY-ESO-1 Antigen in Melanomen und bei p53 in Lungenkrebs [Jäger et al., 1998; Ichiki et al., 2004].

4.2 Gliome

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer minimal invasiven Methode zur Differenzierung von Gliomen basierend auf Autoantikörperantworten. Eine solche Differenzierung könnte als Basis für eine serumbasierende Früherkennung von Gliomen dienen. Auch weitere Anwendungen zur Vorhersage des Therapieverlaufs, der Therapieüberwachung, des Progressionsverlaufs sowie der Prognose sind denkbar. Gliome zeigen eine große Variabilität in Bezug auf Histologie, individuelle Prognose oder das Ansprechen auf verschiedene Therapieformen. Auch zeigen Gliome eine große Heterogenität in Bezug auf genetische Veränderungen.

4.2.1 Klassifikation von Gliomen anhand von Seroreaktivitätsmustern mittels serologischem Spotassay

Der bereits zur Differenzierung von Meningeomen verwendete serologische Spotassay wurde auf seine Anwendbarkeit bei Gliomen getestet. Hierzu wurde ein Panel aus 35 vorher in der Arbeitsgruppe bereits ermittelten Hirntumor-assoziierten Antigenen zusammengestellt [Struss et al., 2001; Fischer et al., 2001, Comtesse et al., 2005; unveröffentlichte Daten]. Mithilfe dieses Panels wurden insgesamt 325 Seren auf Vorhandensein von Autoantikörpern gegen jedes der 35 Antigene hin untersucht. Zu diesen 325 Seren zählten nicht nur Seren von Gliompatienten und gesunden Kontrollen, sondern auch eine Vielzahl an Seren von Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen, wie z. B. Multipler Sklerose, sowie von Patienten mit anderen intrakraniellen Tumoren. Es gibt zurzeit keine vergleichbare Studie, die eine größere Anzahl an Tumor- oder Kontrollseren im Hinblick auf Tumor-assoziierte Antigene hin untersucht hat. Die Ergebnisse dieser Untersuchung wurden in dem Journal „*Clinical Cancer Research*“ veröffentlicht [Ludwig et al., 2008].

Anhand ihres Seroreaktivitätsmusters gegenüber diesen 35 Antigenen konnten die Seren der Gliompatienten von den Seren aller anderen Kontrollen mit einer diagnostischen Genauigkeit von 86,2 % differenziert werden, was bedeutet, dass 86 von 100 untersuchten Seren korrekt klassifiziert wurden. Die Trennung von Gliomen und Gesunden bzw. von Gliomen und Meningeomen war mit einer Genauigkeit von 86,5 % bzw. 91,9 % sogar noch erfolgreicher.

Auch in diesem Set an Antigenen zeigte sich, dass einige Antigene wertvoller für eine bestimmte Differenzierung waren als andere. Zu den zur Differenzierung von Gliomen am besten geeigneten Antigenen zählten die Gene „*squamous cell carcinoma antigen recognized by T cells*“ (SART1), „*natural killer-tumor recognition sequence*“ (NKTR), das bereits für die Klassifizierung von Meningeomen geeignete RTN4 und „*BRCA1 associated protein*“ (BRAP). Das Protein SART1 ist essenziell für das richtige Splicen der prä-mRNA verantwortlich sind [Makarova et al., 2001]. Inhibierung von SART1 durch siRNA führte zu einer Beeinträchtigung der prä-mRNA-Prozessierung von Zellzyklusgenen in HeLa-Zellen [Kittler et al., 2004]. NKTR zeigt eine starke Expression an der Oberfläche von NK-Zellen und ermöglicht dort die Erkennung von Tumorzellen über MHC-unabhängige Mechanismen [Anderson et al., 1993; Frey et al., 1991]. Die Expression von NKTR auf den Gliomzellen kann so möglicherweise deren Erkennung durch das Immunsystem stören. RTN4 ist ein starker Inhibitor des Neuritenwachstums und wurde im Zusammenhang mit autoimmuner Demyelinierung beschrieben [Spillmann et al., 1998; Karnezis et al., 2004]. BRAP spielt eine Rolle als Modulator im Ras/Map-Kinase Signalweg [Matheny et al., 2004].

Zusammenfassend konnte in dieser Untersuchung gezeigt werden, dass sich Seroreaktivitätsmuster auch zur indirekten Detektion von Gliomen eignen. Trotz der geringen Anzahl von 35 untersuchten Antigenen konnte eine Differenzierung der Gliome von vielfältigen Kontrollen u. a. von anderen intrakraniellen Tumoren mit hoher Sensitivität und Spezifität erreicht werden. Allerdings reichen, wie schon bei den Meningeomen, Sensitivität und Spezifität noch nicht aus, um einen solchen Screeningtest als diagnostisches Mittel in der Klinikroutine einzusetzen. Hierfür müssen sowohl Spezifität als auch Sensitivität noch weiter erhöht werden, was eine Identifizierung weiterer für die Klassifizierung von Gliomen nützlichen Antigene voraussetzt.

4.2.2 Klassifikation von Gliomen anhand von Seroreaktivitätsmustern mittels Proteinmakroarray

Analog zu den Untersuchungen an Meningeomen wurden weitere Gliom-assoziierte Antigene durch Screening des mit 1827 *E.coli* exprimierten Proteinen besetzten Proteinmakroarrays mit Seren von Gliompatienten identifiziert. Auch an dieser Stelle wurde versucht, die Seroreaktivitätsmuster der Gliompatienten von denen der gesunden Kontrollen zu differenzieren. Hierbei wurde eine diagnostische Genauigkeit von 88,8 % erreicht, was eine leichte Verbesserung gegenüber der Differenzierung von Gliomen mithilfe des serologischen Spotassays darstellt. Eine Unterscheidung von Gliomen unterschiedlichen WHO-Grades aufgrund ihres Seroreaktivitätsmusters war an dieser Stelle nicht möglich. Allerdings konnte eine Trennung von Glioblastomen und gesunden Kontrollen mit einer sehr hohen Genauigkeit von 92,9 % erzielt werden.

Zu den Gliom-assoziierten Antigenen, welche einen hohen Informationsgehalt für die Differenzierung von Gliomen und Gesunden besitzen, zählen u. a. die Antigene „*glial fibrillary acidic protein*“ (GFAP), „*vimentin*“ (VIM), „*inhibitor of growth family member 4*“ (ING4), „*pleiotrophin precursor*“ (PTN) und „*tetratricopeptide repeat protein 3*“ (TTC3). Jedes dieser Proteine ist bereits im Zusammenhang mit Gliomen bekannt. GFAP und TTC3 sind bereits in der „*Cancer Immunome Database*“ als Autoantigene, welche mit Gliomseren identifiziert wurden, niedergelegt (<http://ludwig-sun5.unil.ch/CancerImmunomeDB/>). ING4 wurde bereits als Gliom-assoziiertes Antigen durch heterologes SEREX-Screening einer aus einer Glioblastom-Zelllinie entstandenen Expressionsbank identifiziert und erfolgreich im oben beschriebenen serologischen Spotassay verwendet [Ludwig et al., 2008]. Für die Antigene VIM und GFAP wurde bereits mithilfe von immunhistochemischen Verfahren eine starke Expression v. a. in Glioblastomen nachgewiesen [Ikota et al., 2006; Colin et al., 2007]. Die Expression von PTN wurde sogar schon mit dem Tumorgrad in Astrozytomen in Verbindung gebracht [Peria et al., 2007]. Es gab bereits erste Versuche in dieser Arbeit als Gliom-assoziierte Antigene identifizierte Proteine in therapeutischen Ansätzen als Targets zu verwenden. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte das Wachstum von GFAP-positiven Tumorzellen mithilfe eines GFAP-selektiven, onkolytischen Adenovirus spezifisch gehemmt werden [Horst et al., 2007].

Neben den bereits im Zusammenhang mit Gliomen bekannten Proteinen, konnten in dieser Arbeit weitere Proteine als immunogen in Gliomen beschrieben werden, bei welchen ein solcher Zusammenhang bisher noch nicht gezeigt wurde. Das Antigen „*development and differentiation enhancing factor 1*“ (DDEF1) zeigte einen hohen diagnostischen Informationsgehalt für die Differenzierung von Glioblastomen und gesunden Kontrollen. Dieses Antigen wurde in einer Arbeit bereits als Marker für metastasierende Prostatakarzinome diskutiert [Lin et al., 2008]. Für „*cytokine-induced apoptosis inhibitor 1*“ (CAIPIN1), ein Antigen, welches sowohl für die Differenzierung von Gliomen als auch für die Differenzierung von Glioblastomen und gesunden Kontrollen einen hohen diagnostischen Informationsgehalt besitzt, wurde bereits eine Rolle in der Resistenz von Magenkrebszellen gegenüber Chemotherapeutika zugesprochen [Hao et al., 2006]. Eine ähnliche Rolle könnte CAIPIN1 auch für die Glioblastome einnehmen, die im Allgemeinen als weitgehend chemoresistent gelten. Viele immunogene Klone mit hohem Informationsgehalt waren homolog zu ribosomalen Proteinen. Insbesondere für „*ribosomal protein S2*“ (RPS2) und „*ribosomal protein S8*“ (RPS8) wurde bereits eine Überexpression mittels Microarray-Analysen in höhergradigen Astrozytomen nachgewiesen [MacDonald et al., 2007].

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit neue Gliom-assoziierte Antigene identifiziert werden, welche sich für eine serologische Erkennung von Gliomen eignen. Dass dies bereits jetzt mit einer Genauigkeit von fast 90 % erreicht werden konnte, spricht für eine generelle Anwendbarkeit der Methode zur indirekten Detektion von Gliomen. Gliome sind zwar die häufigsten Hirntumore des Menschen, zeigen allerdings eine nur geringfügig höhere Inzidenz als Meningeome, weswegen eine serologische Diagnostik auch hier nur bedingt Sinn macht. Ebenso wie für die Meningeome gibt es keine Hochrisikogruppen, bei denen ein Vorsorgescreening auf Basis einer solchen Seroanalyse angewandt werden könnte. Die Bedeutung einer solchen Methode liegt auch hier eher in der Differenzierung der verschiedenen WHO-Grade bzw. in der Differenzierung von Gliomen mit unterschiedlichem Proliferationsverhalten oder Rezidivverhalten. Einen großen Gewinn könnte eine solche Untersuchung bringen, wenn es möglich wäre, das Ansprechen von Gliomen, v. a. von Glioblastomen, auf ein bestimmtes Therapieschema im einzelnen Patienten vorherzusagen und so den behandelnden Arzt bei der Entscheidungsfindung einer adäquaten Therapie zu unterstützen. Dies müsste allerdings zunächst bei entsprechenden Patienten getestet werden und möglicherweise sogar noch nach weiteren informativen, Gliom-assoziierten Antigenen gesucht werden.

4.3 Vergleichende Analyse Klassifikations-relevanter Antigene in Meningeomen und Gliomen und mögliche Bezüge zur Pathologie von Hirntumoren

Bei näherer Betrachtung der Klassifikations-relevanten Antigene zur Differenzierung von Meningeomen und Gliomen stellt sich die Frage, ob es für die vier analysierten Klassifikationen (Meningeome versus Gesunde, Meningeome versus Gliome, Gliome versus Gesunde und WHO IV Gliome versus Gesunde) Antigene gibt, die für mehr als eine der Klassifikationen informativ sind. Es wurden 19 Antigene identifiziert, die informative AUC-Werte für mehr als eine Trennung aufwiesen (siehe Tabelle 29). Insgesamt 12 Klone zeigten sowohl für die Differenzierung von Gliomen und Gesunden, als auch für die Differenzierung von Glioblastomen und Gesunden informative AUC-Werte. Dieser Überlapp lässt sich durch die Gruppenzusammensetzung der untersuchten Gliompatienten erklären, welche mit 28 Patienten ungefähr zur Hälfte aus Glioblastompatienten bestand.

Zwei Klone, nämlich „*development and differentiation enhancing factor 1*“ (DDEF1) und „*amyloid beta A4 precursor protein-binding*“ (APBB1) waren sowohl für die Trennung von Meningeomen und Gesunden als auch für die Differenzierung von Glioblastomen und Gesunden informativ. Das Gen DDEF1, auch unter dem Namen AMAP1 bekannt, wurde bereits als Marker für metastasierende Prostatakarzinome diskutiert und mit invasivem Wachstumsverhalten in Brustkrebs in Verbindung gebracht [Lin et al., 2008; Onodera et al., 2005]. Es konnte gezeigt werden, dass DDEF1 in invasiv wachsenden Brustkrebszellen sehr stark exprimiert ist und dass eine Inhibition der DDEF1-Expression durch siRNA dieses invasive Wachstumsverhalten *in vitro* und *in vivo* sogar eine Metastasenbildung verhindert. Möglicherweise könnte DDEF1 auch bei der Invasivität des Wachstums von Glioblastomen eine Rolle spielen. Sabo et al. zeigten eine Rolle von APBB1 (auch bekannt als Fe65-Antigen) in Verbindung mit APP1 in der Aktin-basierenden Zellmotilität [Sabo et al., 2001].

Tab. 28: Relevante Antigene für die vier durchgeführten Klassifikationen

Klon ID	Ensembl ID	AUC-Wert				Antigen
		Meningeom vs. Gesund	Meningeom vs. Gliom	Gliom vs. Gesund	Glioblastom vs. Gesund	
B17512	ENSG00000026025	0,40	0,71	0,22	0,17	vimentin
J15577	ENSG00000026025	0,23	0,49	0,25	0,26	vimentin
G20580	ENSG00000105220	0,29	0,52	0,27	0,26	glucose-6-phosphate isomerase
H18530	ENSG00000091140	0,29	0,53	0,26	0,26	dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial precursor
J17570	ENSG00000074800	0,20	0,30	0,44	0,43	enolase 1
M15565	ENSG00000166313	0,28	0,42	0,33	0,29	amyloid beta A4 precursor protein- binding family B member 1
D18552	ENSG00000153317	0,28	0,48	0,31	0,28	development and differentiation- enhancing factor
K19595	ENSG00000142937	0,40	0,68	0,23	0,18	40S ribosomal protein S8
F10567	ENSG00000005194	0,40	0,62	0,29	0,28	splice isoform 2 of Q6FI81
G13583	ENSG00000167588	0,40	0,63	0,28	0,23	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1
D14506	ENSG00000198708	0,41	0,62	0,29	0,28	ubiquitin and ribosomal protein S27a precursor
O03589	ENSG00000140988	0,42	0,64	0,29	0,24	ribosomal protein S2
H22512	ENSG00000125817	0,42	0,63	0,29	0,29	centromere protein B
G19583	ENSG00000122406	0,42	0,65	0,25	0,26	60S ribosomal protein L5
C09514	ENSG00000170759	0,45	0,64	0,29	0,29	kinesin family member 5B
M19590	ENSG00000140988	0,35	0,65	0,23	0,19	40S ribosomal protein S2
H23512	ENSG00000180626	0,36	0,57	0,29	0,28	---
F16565	ENSG00000083812	0,36	0,61	0,25	0,28	Zinc finger protein 324
E14506	ENSG00000198708	0,39	0,59	0,27	0,24	similar to ubiquitin and ribosomal protein S27a precursor

Fett = als informativ angesehene AUC-Werte

Der Klon „*enolase 1*“ (ENO1) war informativ für die Trennung von Meningeomen und Gesunden und für die Klassifikation von Meningeomen und Gliomen. Das Enzym *enolase* katalysiert in der Glykolyse die Umsetzung von 2-Phospho-D-Glycerat zu Phospho-Enol-Pyruvat. *Enolase 1* stellt die alpha-Isoform dieses Enzyms dar. Die Ergebnisse von Feo et al. weisen auf eine Tumorsuppressor-Aktivität von *enolase 1* durch transkriptionelle Repression des c-myc Onkogen-Promotors hin [Feo et al., 2000]. Autoantikörper gegen *enolase 1* wurden bereits in Patienten mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen, u. a. Morbus Crohn, Colitis Ulzerosa oder systemischer Lupus erythematodes gefunden [Übersicht in Pancholi, 2001]. Die Expression von *enolase 1* ist in Astrozytomen und Meningeomen schwächer als in

Normalhirn, steigt aber bei Astrozytomen mit steigendem Malignitätsgrad [Joseph et al., 1996]. Da die Gruppe der untersuchten Gliome ca. 50 % Glioblastome enthält, welche laut Joseph et al. eine stärkere Expression von *enolase 1* zeigen als Meningeome, allerdings in der vorliegenden Arbeit eine stärkere Immunantwort gegen *enolase 1* in Meningeomen festgestellt wurde als in Gliomen, kann an dieser Stelle kein Zusammenhang von starker Expression und Seroreaktivität gegenüber *enolase 1* bei Hirntumor-Patienten festgestellt werden.

Nur vier Klone waren für mehr als zwei Klassifikationen geeignet. Zwei dieser Klone repräsentieren das Antigen „*vimentin*“ (VIM). Der *vimentin*-Klon B17512 war für die Klassifikationen Gliome versus Gesunde, Glioblastome versus Gesunde und Meningeome versus Gliome sehr informativ, während der *vimentin*-Klon J15577 für die Klassifikation Gliome versus Gesunde, Glioblastome versus Gesunde und Meningeome versus Gesunde hilfreich war. Die Expression von *vimentin*, einem Strukturprotein des intermediären Filaments, sowohl in Meningeomen als auch in Gliomen wurde vielfach gezeigt [Ikota et al., 2006; Colin et al., 2007; Louis et al., 2007]. Auch wurden bereits Autoantikörper gegen *vimentin* in Patienten mit rheumatoider Arthritis und nicht-Hodgkin-Lymphomen gefunden [CIDB; Bang et al., 2007]. Möglicherweise zeigen die Autoantikörper gegen *vimentin* in Meningeom- und Gliomseren Veränderungen auf struktureller Ebene der Tumorzellen an.

Zwei weitere Klone, der Klon „*glucose-6-phosphate isomerase*“ (GPI) sowie der Klon „*dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial precursor*“ (DLD), besaßen jeweils einen hohen Informationsgehalt für die Klassifikationen Gliome versus Gesunde, Glioblastome versus Gesunde und Meningeome versus Gesunde. Das Enzym GPI katalysiert die Reaktion von D-Glukose-6-Phosphat zu D-Fructose-6-Phosphat der Glykolyse und zählt somit zu den Haushaltsgenen. Trotz dieser ubiquitären Expression konnten Autoantikörper gegen GPI in Patienten mit rheumatoider Arthritis festgestellt werden [Schaller et al., 2001]. Das Enzym DLD gehört zu dem Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex des mitochondrialen Glycinabbauweges, der für den Abbau von verzweigt-kettigen Aminosäuren verantwortlich ist. DLD wurde bereits als Meningeom-assoziiertes Antigen von Comtesse et al. identifiziert [Comtesse et al., 2005].

Auffällig ist, dass die Klone, die für mehr als eine Klassifikation informativ waren, zum überwiegenden Teil Proteine repräsentieren wie sie in fast jeder Zelle vorkommen. Neben

Enzymen der Glykolyse (ENO1 oder GPI) oder anderer Stoffwechselwege (DLD), sind dies vor allem ribosomale Proteine, aber auch Strukturproteine (VIM). Dies deutet darauf hin, dass die Autoantikörperantwort in Hirntumorpatienten nicht auf Tumor-spezifische Expression bestimmter Antigene zurückzuführen ist, sondern möglicherweise viel eher Veränderungen in den Tumorzellen in zentralen Stoffwechselwegen widerspiegelt.

4.4 Seroreaktivitätsmuster als diagnostisches Mittel zur Erkennung von Krebserkrankungen

Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden Muster von Autoantikörperreaktionen gegen humane Tumoren meist durch SEREX oder verwandte Verfahren bzw. mittels sogenanntem Phage-Display, welches Expressionsbanken, die als Kapsidfusionsproteine an der Oberfläche von Phagen exprimiert werden, identifiziert. Die Verwendung von Seroreaktivitätsmustern zur Klassifikation von Krebspatienten ist noch relativ neu, gewinnt aber immer mehr Zulauf. Tabelle 28 gibt eine Übersicht über die in dieser Arbeit erzielten Klassifikationsergebnisse im Vergleich zu anderen auf diesem Gebiet veröffentlichten Studien. Das Phage-Display-Verfahren wurde bereits erfolgreich zur serologischen Klassifikation von Ovarialkarzinomen, Lungen- sowie Prostatakrebs eingesetzt [Chatterjee et al., 2006; Erkanli et al., 2006; Zhong et al., 2005; Chen et al., 2007; Wang et al., 2005]. Ovarialkarzinome ließen sich mit einer Spezifität von 90 % und einer Sensitivität von 32 % anzeigen [Chatterjee et al., 2006], Adenokarzinome der Lunge sogar mit einer Spezifität von 86 % und einer Sensitivität von 85 % [Chen et al., 2007]. Patienten mit nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen konnten mit einer Spezifität von 95 % und einer Sensitivität von 90 % identifiziert werden [Zhong et al., 2005], während bei Patienten mit Prostatakarzinomen eine Spezifität von 88,2 % und eine Sensitivität von 81,6 % erreicht wurden [Wang et al., 2005]. Trotz der immun-privilegierten Lage der Hirntumore gelang die Differenzierung sowohl von Meningeomen als auch von Gliomen mit beiden Verfahren, dem serologischen Spotassay und dem Proteinmakroarray, im Vergleich zu den von anderen Gruppen veröffentlichten Studien zur serologischen Detektion von Krebserkrankungen mit z. T. höherer Genauigkeit.

Tab. 29: Vergleich der erreichten Klassifikationsresultate mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen für andere Krebsarten

Klassifikation (Gruppe 1(Anzahl) vs Gruppe 2(Anzahl))				Erreichte Ergebnisse				Referenz
Gruppe 1	Gruppe 2	Antigene	Methode	Spezifität	Sensitivität	Genauigkeit	AUC	
Meningeome (93)	Gesunde (90)	57	serologischer Spotassay	96,2	84,5	90,3	0,96	Wang et al. Chen et al. Zhong et al. Chatterjee et al. Erkanli et al. Ran et al. Lin et al. Zhong et al.
WHO I (40)	Gesunde (90)	57	serologischer Spotassay	98,6	87,5	95,2	0,97	
WHO II (27)	Gesunde (90)	57	serologischer Spotassay	98,8	67,6	91,8	0,97	
WHO III (26)	Gesunde (90)	57	serologischer Spotassay	97,9	72,2	92,1	0,9	
Meningeom (93)	Gesunde (90)	38	serologischer Spotassay	96,4	85,1	90,6	0,96	
WHO I (40)	Gesunde (90)	12	serologischer Spotassay	97,5	91,3	95,6	0,97	
WHO II (27)	Gesunde (90)	36	serologischer Spotassay	98,9	70,1	92,2	0,97	
WHO III (26)	Gesunde (90)	53	serologischer Spotassay	97,9	73,9	92,5	0,9	
Meningeome (53)	Gesunde (60)	1417	Proteinmakroarray	95,6	91,8	93,8	-	
Meningeome (53)	Gliome (57)	1417	Proteinmakroarray	85,0	91,4	88,0	-	
Gliome (88)	alle Kontrollgruppen (237)	35	serologischer Spotassay	92,4	70,1	86,2	0,93	
Gliome (88)	Gesund (82)	35	serologischer Spotassay	87,8	85,2	86,5	0,92	
Gliome (88)	neurologische Erkrankungen (60)	35	serologischer Spotassay	81,7	93,2	87,8	0,94	
Gliome (88)	andere intrakraniale Tumore (95)	35	serologischer Spotassay	89,5	86,4	88,0	0,95	
Gliome (88)	Meningeome (35)	35	serologischer Spotassay	96,6	80,0	91,9	0,95	
Gliome (57)	Gesunde (60)	1417	Proteinmakroarray	90,3	87,3	88,8	-	
WHO IV (28)	Gesunde (60)	1417	Proteinmakroarray	98,5	80,9	92,9	-	
WHO IV (28)	WHO II/III Gliome (22)	1417	Proteinmakroarray	42,9	57,0	50,8	-	
Prostata Krebs (60)	Gesunde (68)	22	Phage Display	88,2	81,6	-	0,93	
Adenokarzinome Lunge (75)	Gesunde (50)	22	Phage Display	86,0	85,3	85,6	-	
nicht kleinzellige Lungenkarzinome (40)	Gesunde (41)	5	Phage Display	87,5	90,2	88,9	-	
Ovarialkarzinome (69)	Gesunde (60)	65	Phage Display	98,0	55,0	-	-	
Epitheliale Ovarialkarzinome (59)	Gesunde (23)	18	Luminex	-	-	-	0,86	
Darmkrebs (24)	Gesunde (24)	6	Phage Display	91,7	91,7	-	-	
Plattenepithelkarzinom des HNO-Bereichs (40)	Kontrollen (40)	130	Phage Display	90,1	79,8	84,9	0,88	
Brustkrebs (87)	Gesunde (87)	3	Phage Disolv	82,8	77,0	79,9	-	

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die zunehmende Menge an Daten die prinzipielle Möglichkeit einer Serum-basierenden Diagnostik bei humanen Tumoren beweist. Allerdings zeigen die bisherigen Daten auch, dass Sensitivität und Spezifität noch nicht annähernd hoch genug sind, dass es zu einer Übernahme in die klinische Praxis ausreichen würde. Bis dahin sind noch weitere Studien notwendig.

Literaturverzeichnis

1. Aarhus M, Bruland O, Bredholt G, Lybaek H, Husebye ES, Krossnes BK, Vedeler C, Wester K, Lund-Johansen M, Knappskog PM (2008) Microarray analysis reveals down-regulation of the tumour suppressor gene WWOX and up-regulation of the oncogene TYMS in intracranial sporadic meningiomas. *J Neurooncol* 88:251-259
2. Anderson SK, Gallinger S, Roder J, Frey J, Young HA, Ortaldo JR (1993) A cyclophilin-related protein involved in the function of natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:542-546
3. Anderson KS, LaBaer J (2005) The sentinel within: exploiting the immune system for cancer biomarkers. *J Proteome Res* 4:1123-1133
4. Backes C, Keller A, Kuentzer J, Kneissl B, Comtesse N, Elnakady YA, Müller R, Meese E, Lenhof HP (2007) GeneTrail--advanced gene set enrichment analysis. *Nucleic Acids Res* 35:W186-192
5. Bang H, Egerer K, Gauliard A, Lütke K, Rudolph PE, Fredenhagen G, Berg W, Feist E, Burmester GR (2007) Mutation and citrullination modifies vimentin to a novel autoantigen for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 56:2503-2511
6. Bauer C, Diesinger I, Brass N, Steinhart H, Iro H, Meese EU (2001) Translation initiation factor eIF-4G is immunogenic, overexpressed, and amplified in patients with squamous cell lung carcinoma. *Cancer* 92:822-829
7. Boström J, Meyer-Puttlitz B, Wolter M, Blaschke B, Weber RG, Lichter P, Ichimura K, Collins VP, Reifenberger G (2001) Alterations of the tumor suppressor genes CDKN2A (p16(INK4a)), p14(ARF), CDKN2B (p15(INK4b)), and CDKN2C (p18(INK4c)) in atypical and anaplastic meningiomas. *Am J Pathol* 159:661-669
8. Bouvier C, Liprandi A, Colin C, Giorgi R, Quilichini B, Metellus P, Figarella-Branger D (2005) Lack of alkaline phosphatase activity predicts meningioma recurrence. *Am J Clin Pathol* 124:252-258

9. Brunner EC, Romeike BF, Jung M, Comtesse N, Meese E (2006) Altered expression of beta-catenin/E-cadherin in meningiomas. *Histopathology* 49:178-187
10. Büssow K, Cahill D, Nietfeld W, Bancroft D, Scherzinger E, Lehrach H, Walter G (1998) A method for global protein expression and antibody screening on high-density filters of an arrayed cDNA library. *Nucleic Acids Res* 26:5007-5008
11. Canelle L, Bousquet J, Pionneau C, Deneux L, Imam-Sghiouar N, Caron M, Joubert-Caron R (2005) An efficient proteomics-based approach for the screening of autoantibodies. *J Immunol Methods* 299:77-89
12. Carvalho LH, Smirnov I, Baia GS, Modrusan Z, Smith JS, Jun P, Costello JF, McDermott MW, Vandenberg SR, Lal A (2007) Molecular signatures define two main classes of meningiomas. *Mol Cancer* 6:64
13. Casiano CA, Mediavilla-Varela M, Tan EM (2006) Tumor-associated antigen arrays for the serological diagnosis of cancer. *Mol Cell Proteomics* 5:1745-1759
14. CBTRUS (2008). Statistical Report: Primary Brain Tumors in the United States, 2000–2004. Published by the Central Brain Tumor Registry of the United States
15. Chang CJ, Shen BJ, Lee SC (1995) Autoregulated induction of the acute-phase response transcription factor gene, *agp/ebp*. *DNA Cell Biol* 14:529-537
16. Chatterjee M, Mohapatra S, Ionan A, Bawa G, Ali-Fehmi R, Wang X, Nowak J, Ye B, Nahhas FA, Lu K, Witkin SS, Fishman D, Munkarah A, Morris R, Levin NK, Shirley NN, Tromp G, Abrams J, Draghici S, Tainsky MA (2006) Diagnostic markers of ovarian cancer by high-throughput antigen cloning and detection on arrays. *Cancer Res* 66:1181-1190

17. Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, Türeci O, Gure AO, Tsang S, Williamson B, Stockert E, Pfreundschuh M, Old LJ (1997) A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1914-1918
18. Chen G, Wang X, Yu J, Varambally S, Yu J, Thomas DG, Lin MY, Vishnu P, Wang Z, Wang R, Fielhauer J, Ghosh D, Giordano TJ, Giacherio D, Chang AC, Orringer MB, El-Hefnawy T, Bigbee WL, Beer DG, Chinnaiyan AM (2007) Autoantibody profiles reveal ubiquitin 1 as a humoral immune response target in lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 67:3461-3467
19. Colin C, Virard I, Baeza N, Tchoghandjian A, Fernandez C, Bouvier C, Calisti A, Tong S, Durbec P, Figarella-Branger D (2007) Relevance of combinatorial profiles of intermediate filaments and transcription factors for glioma histogenesis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33:431-439
20. Comtesse N, Heckel D, Rácz A, Brass N, Glass B, Meese E (1999) Five novel immunogenic antigens in meningioma: cloning, expression analysis, and chromosomal mapping. *Clin Cancer Res* 5:3560-3568
21. Comtesse N, Niedermayer I, Glass B, Heckel D, Maldener E, Nastainczyk W, Feiden W, Meese E (2002) MGEA6 is tumor-specific overexpressed and frequently recognized by patient-serum antibodies. *Oncogene* 21:239-247
22. Comtesse N, Zippel A, Walle S, Monz D, Backes C, Fischer U, Mayer J, Ludwig N, Hildebrandt A, Keller A, Steudel WI, Lenhof HP, Meese E (2005) Complex humoral immune response against a benign tumor: frequent antibody response against specific antigens as diagnostic targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9601-9606
23. Cuevas IC, Slocum AL, Jun P, Costello JF, Bollen AW, Riggins GJ, McDermott MW, Lal A (2005) Meningioma transcript profiles reveal deregulated Notch signaling pathway. *Cancer Res* 65:5070-5075

24. Cui JW, Li WH, Wang J, Li AL, Li HY, Wang HX, He K, Li W, Kang LH, Yu M, Shen BF, Wang GJ, Zhang XM (2005) Proteomics-based identification of human acute leukemia antigens that induce humoral immune response. *Mol Cell Proteomics* 4:1718-1724
25. DeLeo AB, Jay G, Appella E, Dubois GC, Law LW, Old LJ (1979) Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:2420-2424
26. Diesinger I, Bauer C, Brass N, Schaefer HJ, Comtesse N, Sybrecht G, Meese E (2002) Toward a more complete recognition of immunoreactive antigens in squamous cell lung carcinoma. *Int J Cancer* 102:372-378
27. Donin N, Jurianz K, Ziporen L, Schultz S, Kirschfink M, Fishelson Z (2003) Complement resistance of human carcinoma cells depends on membrane regulatory proteins, protein kinases and sialic acid. *Clin Exp Immunol* 131:254-263
28. Dönnes P, Hoglund A, Sturm M, Comtesse N, Backes C, Meese E, et al. (2004) Integrative analysis of cancer-related data using CAP. *FASEB J* 12:1465-1467
29. Erkanli A, Taylor DD, Dean D, Eksir F, Egger D, Geyer J, Nelson BH, Stone B, Fritsche HA, Roden RB (2006) Application of Bayesian modeling of autologous antibody responses against ovarian tumor-associated antigens to cancer detection. *Cancer Res.* 66:1792-1798
30. Fathallah-Shaykh HM, He B, Zhao LJ, Engelhard HH, Cerullo L, Lichter T, Byrne R, Munoz L, Von Roenn K, Rosseau GL, Glick R, Sherman C, Farooq K (2003) Genomic expression discovery predicts pathways and opposing functions behind phenotypes. *J Biol Chem* 278:23830-23833
31. Feo S, Arcuri D, Piddini E, Passantino R, Giallongo A (2000) ENO1 gene product binds to the c-myc promoter and acts as a transcriptional repressor: relationship with Myc promoter-binding protein 1 (MBP-1). *FEBS Lett* 473:47-52

32. Fernández Madrid F (2005) Autoantibodies in breast cancer sera: candidate biomarkers and reporters of tumorigenesis. *Cancer Lett* 23:187-198
33. Fischer U, Struss AK, Hemmer D, Pallasch CP, Steudel WI, Meese E (2001) Glioma-expressed antigen 2 (GLEA2): a novel protein that can elicit immune responses in glioblastoma patients and some controls. *Clin Exp Immunol* 126:206-213
34. Fosså A, Siebert R, Aasheim HC, Maelandsmo GM, Berner A, Fosså SD, Paus E, Smeland EB, Gaudernack G (2000) Identification of nucleolar protein No55 as a tumour-associated autoantigen in patients with prostate cancer. *Br J Cancer* 83:743-749
35. Fosså A, Alsøe L, Cramer R, Funderud S, Gaudernack G, Smeland EB (2004) Serological cloning of cancer/testis antigens expressed in prostate cancer using cDNA phage surface display. *Cancer Immunol Immunother* 53:431-438
36. Frey JL, Bino T, Kantor RRS, Segal DM, Giardina SL, Roder J, Anderson S, Ortaldo JR (1991) Mechanism of target cell recognition by natural killer cells: characterization of a novel triggering molecule restricted to CD3- large granular lymphocytes. *J Exp Med* 174:1527-1536
37. Gutmann DH, Sherman L, Seftor L, Haipok C, Hoang Lu K, Hendrix M (1999) Increased expression of the NF2 tumor suppressor gene product, merlin, impairs cell motility, adhesion and spreading. *Hum Mol Genet* 8:267-275
38. Hao Z, Li X, Qiao T, Du R, Hong L, Fan D (2006) CIAPIN1 confers multidrug resistance by upregulating the expression of MDR-1 and MRP-1 in gastric cancer cells. *Cancer Biol Ther* 5:261-266
39. Harada T, Irving RM, Xuereb JH, Barton DE, Hardy DG, Moffat DA, Maher ER (1996) Molecular genetic investigation of the neurofibromatosis type 2 tumor suppressor gene in sporadic meningioma. *J Neurosurg* 84:847-851

40. Heckel D, Comtesse N, Brass N, Blin N, Zang KD, Meese E (1998) Novel immunogenic antigen homologous to hyaluronidase in meningioma. *Hum Mol Genet* 7:1859-1872
41. Hong SH, Misek DE, Wang H, Puravs E, Giordano TJ, Greenson JK, Brenner DE, Simeone DM, Logsdon CD, Hanash SM. (2004) An autoantibody-mediated immune response to calreticulin isoforms in pancreatic cancer. *Cancer Res* 64:5504-5510
42. Horst M, Brouwer E, Verwijnen S, Rodijk M, de Jong M, Hoeben R, de Leeuw B, Smitt PS (2007) Targeting malignant gliomas with a glial fibrillary acidic protein (GFAP)-selective oncolytic adenovirus. *J Gene Med* 9:1071-1079
43. Howng SL, Wu CH, Cheng TS, Sy WD, Lin PC, Wang C, Hong YR (2002) Differential expression of Wnt genes, beta-catenin and E-cadherin in human brain tumors. *Cancer Lett* 183:95-101
44. Ichiki Y, Takenoyama M, Mizukami M, So T, Sugaya M, Yasuda M, So T, Hanagiri T, Sugio K, Yasumoto K (2004) Simultaneous cellular and humoral immune response against mutated p53 in a patient with lung cancer. *J Immunol* 172:4844-4850
45. Ikota H, Kinjo S, Yokoo H, Nakazato Y (2006) Systematic immunohistochemical profiling of 378 brain tumors with 37 antibodies using tissue microarray technology. *Acta Neuropathol* 111:475-482
46. Jääskeläinen J (1986) Seemingly complete removal of histologically benign intracranial meningioma: late recurrence rate and factors predicting recurrence in 657 patients. A multivariate analysis. *Surg Neurol* 26:461-469
47. Jäger E, Chen YT, Drijfhout JW, Karbach J, Ringhoffer M, Jäger D, Arand M, Wada H, Noguchi Y, Stockert E, Old LJ, Knuth A (1998) Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J Exp Med* 187:265-270

48. Joseph J, Cruz-Sánchez FF, Carreras J (1996) Enolase activity and isoenzyme distribution in human brain regions and tumors. *J Neurochem* 66:2484-2490
49. Karnezis T, Mandemakers W, McQualter JL, Zheng B, Ho PP, Jordan KA, Murray BM, Barres B, Tessier-Lavigne M, Bernard CC (2004) The neurite outgrowth inhibitor Nogo A is involved in autoimmune-mediated demyelination. *Nat Neurosci* 7:736-744
50. Keller A, Ludwig N, Comtesse N, Hildebrandt A, Meese E, Lenhof HP (2006) A minimally invasive multiple marker approach allows highly efficient detection of meningioma tumors. *BMC Bioinformatics* 7:539
51. Keller A, Comtesse N, Ludwig N, Meese E, Lenhof HP (2007) SePaCS--a web-based application for classification of seroreactivity profiles. *Nucleic Acids Res* 35:W683-7
52. Keller A, Ludwig N, Comtesse N, Henn W, Steudel WI, Lenhof HP, Meese E (2008a) Combining gene expression signatures and autoantibody profiles in human meningioma. *Gene Ther.* 2008 Aug 14
53. Keller A, Backes C, Al-Awadhi M, Gerasch A, Kuntzer J, Kohlbacher O, Kaufmann M, Lenhof HP (2008b) GeneTrailExpress: a web-based pipeline for the statistical evaluation of microarray experiments. *BMC Bioinformatics* 9:552.
54. Keller A, Ludwig N, Backes C, Romeike BF, Comtesse N, Henn W, Steudel WI, Mawrin C, Lenhof HP, Meese E (2009) Genome wide expression profiling identifies specific deregulated pathways in meningioma. *Int J Cancer* 124:346-351
55. Kirkby NF, Jefferies SJ, Jena R, Burnet NG (2007) A mathematical model of the treatment and survival of patients with high-grade brain tumours. *J Theor Biol* 245:112-124
56. Kittler R, Putz G, Pelletier L, Poser I, Heninger AK, Drechsel D, Fischer S, Konstantinova I, Habermann B, Grabner H, Yaspo ML, Himmelbauer H, Korn B, Neugebauer K, Pisabarro MT, Buchholz F (2004) An endoribonuclease-prepared siRNA screen in human cells identifies genes essential for cell division. *Nature* 432:1036-1040

57. Lekanne Deprez RH, Riegman PH, Groen NA, Warringa UL, van Biezen NA, Molijn AC, Bootsma D, de Jong PJ, Menon AG, Kley NA, et al. (1995) Cloning and characterization of MN1, a gene from chromosome 22q11, which is disrupted by a balanced translocation in a meningioma. *Oncogene* 10:1521-1528
58. Lin HS, Talwar HS, Tarca AL, Ionan A, Chatterjee M, Ye B, Wojciechowski J, Mohapatra S, Basson MD, Yoo GH, Peshek B, Lonardo F, Pan CJ, Folbe AJ, Draghici S, Abrams J, Tainsky MA (2007) Autoantibody approach for serum-based detection of head and neck cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16:2396-2405
59. Lin D, Watahiki A, Bayani J, Zhang F, Liu L, Ling V, Sadar MD, English J, Fazli L, So A, Gout PW, Gleave M, Squire JA, Wang YZ (2008) ASAP1, a gene at 8q24, is associated with prostate cancer metastasis. *Cancer Res* 68:4352-4359
60. Litvak DA, Gupta RK, Yee R, Wanek LA, Ye W, Morton DL (2004) Endogenous immune response to early- and intermediate-stage melanoma is correlated with outcomes and is independent of locoregional relapse and standard prognostic factors. *J Am Coll Surg* 198:27-35
61. Louis D, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK (eds) (2007) WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. IARC Press, Lyon
62. Ludwig N, Keller A, Comtesse N, Rheinheimer S, Pallasch C, Fischer U, Fassbender K, Steudel WI, Lenhof HP, Meese E (2008) Pattern of serum autoantibodies allows accurate distinction between a tumor and pathologies of the same organ. *Clin Cancer Res* 14:4767-4774
63. MacDonald TJ, Pollack IF, Okada H, Bhattacharya S, Lyons-Weiler J (2007) Progression-associated genes in astrocytoma identified by novel microarray gene expression data reanalysis. *Methods Mol Biol* 377:203-222
64. Makarova OV, Makarov EM, Lührmann R (2001) The 65 and 110 kDa SR-related proteins of the U4/U6.U5 tri-snRNP are essential for the assembly of mature spliceosomes. *EMBO J* 20:2553-2563

65. Matheny SA, Chen C, Kortum RL, Razidlo GL, Lewis RE, White MA (2004) Ras regulates assembly of mitogenic signalling complexes through the effector protein IMP. *Nature* 427:256-260
66. Mawrin C, Sasse T, Kirches E, Kropf S, Schneider T, Grimm C, Pambor C, Vorwerk CK, Firsching R, Lendeckel U, Dietzmann K (2005) Different activation of mitogen-activated protein kinase and Akt signaling is associated with aggressive phenotype of human meningiomas. *Clin Cancer Res* 11:4074-4082
67. Müller P, Henn W, Niedermayer I, Ketter R, Feiden W, Steudel WI, Zang KD, Steilen-Gimbel H (1999) Deletion of chromosome 1p and loss of expression of alkaline phosphatase indicate progression of meningiomas. *Clin Cancer Res* 5:3569-3577
68. Ohgaki H, Kleihues P (2005) Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:479-489
69. Ohgaki H, Kleihues P (2007) Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 170:1445-1453
70. Oliveira AM, Ross JS, Fletcher JA (2005) Tumor suppressor genes in breast cancer: the gatekeepers and the caretakers. *Am J Clin Pathol* 124:S16-28
71. Onodera Y, Hashimoto S, Hashimoto A, Morishige M, Mazaki Y, Yamada A, Ogawa E, Adachi M, Sakurai T, Manabe T, Wada H, Matsuura N, Sabe H (2005) Expression of AMAP1, an ArfGAP, provides novel targets to inhibit breast cancer invasive activities. *EMBO J* 24:963-973
72. Pancholi V. (2001) Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell Mol Life Sci* 58:902-920

73. Peria FM, Neder L, Marie SK, Rosemberg S, Oba-Shinjo SM, Colli BO, Gabbai AA, Malheiros SM, Zago MA, Panepucci RA, Moreira-Filho CA, Okamoto OK, Carlotti CG Jr (2007) Pleiotrophin expression in astrocytic and oligodendroglial tumors and it's correlation with histological diagnosis, microvascular density, cellular proliferation and overall survival. *J Neurooncol* 84:255-261
74. Perry A, Gutmann DH, Reifenberger G (2004) Molecular pathogenesis of meningiomas. *J Neurooncol* 70:183-202
75. Peyrard M, Fransson I, Xie YG, Han FY, Rutledge MH, Swahn S, Collins JE, Dunham I, Collins VP, Dumanski JP (1994) Characterization of a new member of the human beta-adaptin gene family from chromosome 22q12, a candidate meningioma gene. *Hum Mol Genet* 3:1393-1399
76. Peyrard M, Seroussi E, Sandberg-Nordqvist AC, Xie YG, Han FY, Fransson I, Collins J, Dunham I, Kost-Alimova M, Imreh S, Dumanski JP (1999) The human LARGE gene from 22q12.3-q13.1 is a new, distinct member of the glycosyltransferase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:598-603
77. Qian F, Odunsi K, Blatt LM, Scanlan MJ, Mannan M, Shah N, Montgomery J, Haddad F, Taylor M (2005) Tumor associated antigen recognition by autologous serum in patients with breast cancer. *Int J Mol Med* 15:137-144
78. Ramachandran N, Hainsworth E, Bhullar B, Eisenstein S, Rosen B, Lau AY, Walter JC, LaBaer J (2004) Self-assembling protein microarrays. *Science* 305:86-90
79. Ran Y, Hu H, Zhou Z, Yu L, Sun L, Pan J, Liu J, Yang Z (2008) Profiling tumor-associated autoantibodies for the detection of colon cancer. *Clin Cancer Res* 14:2696-2700
80. Rausing A, Ybo W, Stenflo J (1970) Intracranial meningioma--a population study of ten years. *Acta Neurol Scand* 46:102-110

81. Rodolfo M, Luksch R, Stockert E, Chen YT, Collini P, Ranzani T, Lombardo C, Dalerba P, Rivoltini L, Arienti F, Fossati-Bellani F, Old LJ, Parmiani G, Castelli C (2003) Antigen-specific immunity in neuroblastoma patients: antibody and T-cell recognition of NY-ESO-1 tumor antigen. *Cancer Res* 63:6948-6955
82. Rutledge MH, Sarrazin J, Rangaratnam S, Phelan CM, Twist E, Merel P, Delattre O, Thomas G, Nordenskjöld M, Collins VP, Dumanski JP, Rouleau GA (1994) Evidence for the complete inactivation of the NF2 gene in the majority of sporadic meningiomas. *Nat Genet* 6:180-184
83. Sabo SL, Ikin AF, Buxbaum JD, Greengard P (2001) The Alzheimer amyloid precursor protein (APP) and FE65, an APP-binding protein, regulate cell movement. *J Cell Biol* 153:1403-1414
84. Sahin U, Türeci O, Schmitt H, Cochlovius B, Johannes T, Schmits R, Stenner F, Luo G, Schobert I, Pfreundschuh M (1995) Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11810-11813
85. Sanson M, Cornu P (2000) Biology of meningiomas. *Acta Neurochir (Wien)* 142:493-505
86. Sayagués JM, Tabernero MD, Maíllo A, Trelles O, Espinosa AB, Sarasquete ME, Merino M, Rasillo A, Vera JF, Santos-Briz A, de Alava E, Garcia-Macias MC, Orfao A (2006) Microarray-based analysis of spinal versus intracranial meningiomas: different clinical, biological, and genetic characteristics associated with distinct patterns of gene expression. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:445-454
87. Schaller M, Burton DR, Ditzel HJ (2001) Autoantibodies to GPI in rheumatoid arthritis: linkage between an animal model and human disease. *Nat Immunol* 2:746-753
88. Schmitz U, Mueller W, Weber M, Sévenet N, Delattre O, von Deimling A (2001) INI1 mutations in meningiomas at a potential hotspot in exon 9. *Br J Cancer* 84:199-201

89. Schubert U, Antón LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR (2000) Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404:770-774
90. Selznick LA, Shamji MF, Fecci P, Gromeier M, Friedman AH, Sampson J (2008) Molecular strategies for the treatment of malignant glioma--genes, viruses, and vaccines. *Neurosurg Rev* 31:141-155
91. Shannon C (1984) A Mathematical Theory of Communication. *The Bell System Technical Journal* 27:623-656
92. Shinohara M, Terada Y, Iwamatsu A, Shinohara A, Mochizuki N, Higuchi M, Gotoh Y, Ihara S, Nagata S, Itoh H, Fukui Y, Jessberger R (2002) SWAP-70 is a guanine-nucleotide-exchange factor that mediates signalling of membrane ruffling. *Nature* 416:759-763
93. Shinoura N, Heffelfinger SC, Miller M, Shamraj OI, Miura NH, Larson JJ, DeTribolet N, Warnick RE, Tew JJ, Menon AG (1994) RNA expression of complement regulatory proteins in human brain tumors. *Cancer Lett* 86:143-149
94. Simon M, Boström JP, Hartmann C (2007) Molecular genetics of meningiomas: from basic research to potential clinical applications. *Neurosurgery* 60:787-798
95. Sioud M, Hansen MH (2001) Profiling the immune response in patients with breast cancer by phage-displayed cDNA libraries. *Eur J Immunol* 31:716-725
96. Somers VA, Brandwijk RJ, Joosten B, Moerkerk PT, Arends JW, Menheere P, Pieterse WO, Claessen A, Scheper RJ, Hoogenboom HR, Hufton SE (2002) A panel of candidate tumor antigens in colorectal cancer revealed by the serological selection of a phage displayed cDNA expression library. *J Immunol* 169:2772-2780
97. Soussi T (2000) p53 Antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review. *Cancer Res* 60:1777-1788

98. Spillmann AA, Bandtlow CE, Lottspeich F, Keller F, Schwab ME (1998) Identification and characterization of a bovine neurite growth inhibitor (bNI-220). *J Biol Chem* 273:19283-19293
99. Struss AK, Romeike BF, Munnia A, Nastainczyk W, Steudel WI, König J, Ohgaki H, Feiden W, Fischer U, Meese E (2001) PHF3-specific antibody responses in over 60% of patients with glioblastoma multiforme. *Oncogene* 20:4107-4114
100. Taieb D, Roignot J, André F, Garcia S, Masson B, Pierres A, Iovanna JL, Soubeyran P (2008) ArgBP2-dependent signaling regulates pancreatic cell migration, adhesion, and tumorigenicity. *Cancer Res* 68:4588-4596.
101. Trivers GE, Cawley HL, DeBenedetti VM, Hollstein M, Marion MJ, Bennett WP, Hoover ML, Prives CC, Tamburro CC, Harris CC (1995) Anti-p53 antibodies in sera of workers occupationally exposed to vinyl chloride. *J Natl Cancer Inst* 87:1400-1407
102. Trivers GE, De Benedetti VM, Cawley HL, Caron G, Harrington AM, Bennett WP, Jett JR, Colby TV, Tazelaar H, Pairolero P, Miller RD, Harris CC (1996) Anti-p53 antibodies in sera from patients with chronic obstructive pulmonary disease can predate a diagnosis of cancer. *Clin Cancer Res* 2:1767-1775
103. Ulanet DB, Torbenson M, Dang CV, Casciola-Rosen L, Rosen A (2003) Unique conformation of cancer autoantigen B23 in hepatoma: a mechanism for specificity in the autoimmune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12361-12366
104. Vernooij MW, Ikram MA, Tanghe HL, Vincent AJ, Hofman A, Krestin GP, Niessen WJ, Breteler MM, van der Lugt A (2007) Incidental findings on brain MRI in the general population. *N Engl J Med* 357:1821-1828
105. von Mensdorff-Pouilly S, Petrakou E, Kenemans P, van Uffelen K, Verstraeten AA, Snijdwint FG, van Kamp GJ, Schol DJ, Reis CA, Price MR, Livingston PO, Hilgers J (2000) Reactivity of natural and induced human antibodies to MUC1 mucin with MUC1 peptides and n-acetylgalactosamine (GalNAc) peptides. *Int J Cancer* 86:702-712

106. Wang Y, Han KJ, Pang XW, Vaughan HA, Qu W, Dong XY, Peng JR, Zhao HT, Rui JA, Leng XS, Cebon J, Burgess AW, Chen WF (2002) Large scale identification of human hepatocellular carcinoma-associated antigens by autoantibodies. *J Immunol* 169:1102-1109
107. Wang X, Yu J, Sreekumar A, Varambally S, Shen R, Giacherio D, Mehra R, Montie JE, Pienta KJ, Sanda MG, Kantoff PW, Rubin MA, Wei JT, Ghosh D, Chinnaiyan AM (2005) Autoantibody signatures in prostate cancer. *N Engl J Med* 353:1224-1235
108. Watson MA, Gutmann DH, Peterson K, Chicoine MR, Kleinschmidt-DeMasters BK, Brown HG, Perry A (2002) Molecular characterization of human meningiomas by gene expression profiling using high-density oligonucleotide microarrays. *Am J Pathol* 161:665-672
109. Wellenreuther R, Kraus JA, Lenartz D, Menon AG, Schramm J, Louis DN, Ramesh V, Gusella JF, Wiestler OD, von Deimling A (1995) Analysis of the neurofibromatosis 2 gene reveals molecular variants of meningioma. *Am J Pathol* 146:827-832
110. Wrobel G, Roerig P, Kokocinski F, Neben K, Hahn M, Reifenberger G, Lichter P (2005) Microarray-based gene expression profiling of benign, atypical and anaplastic meningiomas identifies novel genes associated with meningioma progression. *Int J Cancer* 114:249-256
111. Zhong L, Hidalgo GE, Stromberg AJ, Khattar NH, Jett JR, Hirschowitz EA (2005) Using protein microarray as a diagnostic assay for non-small cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 172:1308-1314
112. Zhong L, Ge K, Zu JC, Zhao LH, Shen WK, Wang JF, Zhang XG, Gao X, Hu W, Yen Y, Kernstine KH (2008) Autoantibodies as potential biomarkers for breast cancer. *Breast Cancer Res.* 10:R40

Im Laufe der Promotion sind folgende Publikationen entstanden:

Ludwig N, Keller A, Heisel S, Leidinger P, Klein V, Rheinheimer S, Andres C, Stephan B, Steudel WI, Burgeth B, Weickert J, Lenhof HP, Meese E.

Serum based diagnostic for glioma patients: Potential and limitations
zur Veröffentlichung fertiggestellt

Ludwig N, Keller A, Heisel S, Leidinger P, Klein V, Rheinheimer S, Andres C, Stephan B, Steudel WI, Burgeth B, Weickert J, Lenhof HP, Meese E.

Novel immunogenic antigens increase classification accuracy in meningioma to 93.84%
zur Veröffentlichung fertiggestellt

Leidinger P, Keller A, Heisel S, **Ludwig N**, Rheinheimer S, Klein V, Andres C, Hamacher J, Huwer H, Burgeth B, Weickert J, Hein M, Stephan B, Stehle I, Lenhof HP, Meese E

Identification of lung cancer with 100% sensitivity and 97.6% specificity by blood testing
zur Veröffentlichung fertiggestellt

Leidinger P, Keller A, Heisel S, **Ludwig N**, Rheinheimer S, Klein V, Andres C, Hamacher J, Huwer H, Wolf J, Stephan B, Stehle I, Lenhof HP, Meese E

Novel autoantigens immunogenic in COPD patients.
zur Veröffentlichung fertiggestellt

Keller A*, **Ludwig N***, Backes C, Romeike BF, Comtesse N, Henn W, Steudel WI, Mawrin C, Lenhof HP, Meese E. Genome wide expression profiling identifies specific deregulated pathways in meningioma. Int J Cancer. 2009 Jan 15;124(2):346-51

Keller A*, **Ludwig N***, Comtesse N, Henn W, Steudel WI, Lenhof HP, Meese E.
Combining gene expression signatures and autoantibody profiles in human meningioma. Gene Ther. 2008 Aug 14.

Ludwig N*, Keller A*, Comtesse N, Rheinheimer S, Pallasch C, Fischer U, Fassbender K, Steudel WI, Lenhof HP, Meese E.

Pattern of serum autoantibodies allows accurate distinction between a tumor and pathologies of the same organ.
Clin Cancer Res. 2008 Aug 1;14(15):4767-74.

Leidinger P, Keller A, **Ludwig N**, Rheinheimer S, Hamacher J, Huwer H, Stehle I, Lenhof HP, Meese E.

Toward an early diagnosis of lung cancer: an autoantibody signature for squamous cell lung carcinoma.
Int J Cancer. 2008 Oct 1;123(7):1631-6.

Keller A, Comtesse N, **Ludwig N**, Meese E, Lenhof HP.

SePaCS--a web-based application for classification of seroreactivity profiles.
Nucleic Acids Res. 2007 Jul; 35(Web Server issue):W683-7.

Keller A, **Ludwig N**, Comtesse N, Hildebrandt A, Meese E, Lenhof HP.

A minimally invasive multiple marker approach allows highly efficient detection of meningioma tumors.
BMC Bioinformatics. 2006 Dec 21;7:53

* gleichberechtigte Erstautoren

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Eckart Meese für die Überlassung des Themas, für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, für seine stete Diskussionsbereitschaft sowie für die vielen hilfreichen Anmerkungen bei der Durchsicht meiner Arbeit.

Im Weiteren möchte ich Prof. Dr. Hans-Peter Lenhof am Zentrum für Bioinformatik in Saarbrücken für die gute und erfolgreiche Kooperation danken. Insbesondere möchte ich mich bei Andreas Keller und Christina Backes für die statistischen Auswertungen der Seroreaktivitätsprofile und Microarrays bedanken.

Frau Dr. Nicole Comtesse danke ich für ihre Unterstützung zu Beginn meiner Arbeit. Bei Frau Dr. Ulrike Fischer möchte ich mich für die vielen fachlichen Ratschläge im Laufe meiner Doktorarbeit sowie für die Durchsicht der Arbeit bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei Esther Maldener für ihre technische Hilfe und ihre immer wieder aufmunternden Worte auf der Renterbank bedanken, die durch so manchen Laboralltag geholfen haben.

Ich möchte allen Mitarbeitern der Humangenetik, insbesondere Petra Leidinger, Sabrina Heisel, Veronika Klein und Stefanie Rheinheimer für die gute Zusammenarbeit danken.

Für wertvolle Anregungen zu Fragen der Formulierung, neuen Rechtschreibung und Optik meiner Arbeit möchte ich mich bei Sabrina Heisel, Sandra Langenfeld und Nasenien Nourkami herzlich bedanken.

Weiterer Dank gilt Prof. Dr. Steudel, Prof. Dr. Fassbender und Dr. Bernhard Stephan für die Überlassung zahlreicher Seren.

Ein großes Danke schön gilt meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und mich immer in allem unterstützt haben.

Nicht zuletzt möchte ich meinem Freund Kai danken, der immer für mich da war, mir viele Dinge vom Hals gehalten hat und mir auch in schwierigeren Zeiten den Rücken gestärkt hat.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Nicole Ludwig
Anschrift: Mainzer Strasse 147
66121 Saarbrücken
Geburtsdatum: 08.03.1981
Geburtsort: Püttlingen
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische Ausbildung:

1991-2000 Marie-Luise-Kaschnitz-Gymnasium
Völklingen
Abschluss: Abitur

Studium:

2000-2005 Biologie mit Schwerpunkt Human- und Molekularbiologie
an der Universität des Saarlandes
Abschluss: Diplom (Note: 1,2)

Prüfungsfächer: Humangenetik
Pharmakologie
Virologie

Thema der Diplomarbeit: „Analyse von Expressions- und Antigenmustern in Meningeomen durch Microarray und Immunoscreening“

2005-2009 Promotion zum Dr. rer. nat. an der medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes am Institut für Humangenetik
Homburg
Thema: „Spezifische Seroreaktivitätsmuster zur minimal-invasiven Detektion humaner Hirntumoren“

Homburg, 12.01.2009